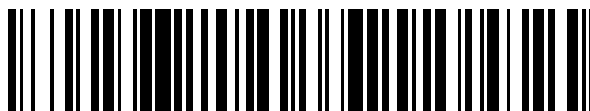


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 406**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2011** **PCT/EP2011/057202**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011** **WO11138392**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011** **E 11718982 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017** **EP 2566892**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de uso para anticuerpos terapéuticos contra la proteína 6 relacionada con las lipoproteínas de baja densidad (LRP6)**

30 Prioridad:

06.05.2010 US 331985 P

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

15.03.2018

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

CONG, FENG;
ETTENBERG, SETH;
HARTLEPP, FELIX y
KLAGGE, INGO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 659 406 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).

Composiciones y procedimientos de uso para anticuerpos terapéuticos contra la proteína 6 relacionada con las lipoproteínas de baja densidad (LRP6)

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a LRP6. La invención se refiere más específicamente a anticuerpos específicos que son antagonistas de LRP6.

Antecedentes de la invención

La vía Wnt/ β -catenina regula diversos procesos biológicos durante el desarrollo y la homeostasis tisular mediante la modulación de la estabilidad proteica de la β -catenina (Clevers y col., (2006) Cell 127: 469-480; y Logan y col., (2004) Annu. Rev. Cell Dev. Biol 20: 781-810) En ausencia de señalización de Wnt, la β -catenina citoplasmática se asocia con el complejo de destrucción de la β -catenina que contiene múltiples proteínas, incluida la coli de la poliposis adenomatosa (APC), la axina y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). En este complejo, la β -catenina es fosforilada constitutivamente por GSK3 y degradada por la ruta del proteasoma. La señal de Wnt se transduce a través de la membrana plasmática a través de dos receptores distintos, el receptor de la serpentina Frizzled y la proteína transmembrana única LRP5 o LRP6. Las proteínas Wnt estimulan el ensamblaje del complejo de señalización Frizzled-LRP5/6 e inducen la fosforilación de los motivos PPPSPxS citoplásmicos de LRP5/6 mediante la GSK3 y la caseína quinasa I. La LRP5/6 fosforilada se une a la axina e inactiva el complejo de degradación de la β -catenina. La β -catenina estabilizada entra en el núcleo, se une a los factores de transcripción de la familia TCF y activa la transcripción.

El dominio grande extracelular de LRP5/6 contiene cuatro regiones de propulsor β de tipo YWTD, seguidas cada una por un dominio de tipo EGF y el dominio de LDLR. Cada región de propulsor contiene seis motivos YWTD que forman una estructura de propulsores β de seis hojas. Los estudios bioquímicos sugieren que las proteínas Wnt interaccionan físicamente con Frizzled y LRP6 e inducen la formación del complejo de señalización Frizzled-LRP6 (Semenov y col., (2001) Curr. Biol 11, 951-961; y Tamai y col., (2000) Nature 407, 530-535). Además de las proteínas Wnt, el dominio grande extracelular de LRP5/6 se une a múltiples moduladores de Wnt secretados, incluyendo el antagonista de Wnt DKK1 y esclerostina (SOST) y el agonista de Wnt R-espondinas.

La regulación alterada de la vía de señalización de Wnt se ha relacionado con muchas enfermedades humanas. La vía de señalización Wnt/LRP5/6 desempeña un papel importante en la homeostasis y la regeneración del tejido. La señalización de Wnt promueve la formación de hueso al aumentar el crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos (Baron y col., (2006) Curr. Top. Dev. Biol 76:103-127). Gain-of-function mutations of LRP5 (Boyden y col., (2002) N. Engl. J Med 346:1513-1521; Little y col., (2002) Am. J Hum. Genet. 70:11-19; Van Wesenbeeck y col., (2003) Am. J Hum. Genet. 72: 763-771) y mutaciones de pérdida de función del antagonista de Wnt SOST (Balemans y col., (2001) Hum. Mol Genet. 10: 537-543; Brunkow y col., (2001) Am. J Hum. Gineta. 68: 577-589) ambos conducen a enfermedades de masa ósea alta. La señalización de Wnt también es crítica para la homeostasis del epitelio intestinal al mantener el estado proliferativo de las células madre en la cripta intestinal (Pinto y col., (2005) Biol Cell 97: 185-196). La señalización de Wnt también es crítica para la reparación y regeneración del riñón (Lin SL PNAS 107: 4194, 2010). Además, las mutaciones en los componentes de la vía, tales como APC y β -catenina, se han asociado con cánceres humanos. Estudios recientes sugieren que la sobreexpresión de las proteínas Wnt y/o el silenciamiento de antagonistas de Wnt, tales como DKK1, WISP y sFRP, promueven el desarrollo y la progresión del cáncer (Akiri y col., (2009) Oncogene 28:2163-2172; Bafico y col., (2004) Cancer Cell 6:497-506; Suzuki et al, (2004) Nat Genet. 36:417-422; Taniguchi y col., (2005) Oncogene. 24:7946-7952; Veeck y col., (2006) Oncogene. 25:3479-3488; Zeng y col., (2007) Hum. Pathol. 38:120-133). Además, se ha implicado a la señalización de Wnt en el mantenimiento de las células madre del cáncer (Jamieson y col., (2004) Cancer Cell 6: 531-533 y Zhao y col., (2007) Cancer Cell 12: 528-541).

Por consiguiente, existe la necesidad de agentes que antagonicen la señalización de Wnt a nivel extracelular como terapia para enfermedades asociadas con una señalización de Wnt canónica aberrante.

El documento WO 2009/056634 describe moléculas de unión agonistas o antagonistas de LRP6 (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos Fab), y su uso para facilitar o inhibir la señalización de la vía Wnt, respectivamente. De forma similar, el documento WO 2009/064944 describe anticuerpos anti-LRP6 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como composiciones farmacéuticas que comprenden tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno. Binnerts y col., (Mol Biol Cell. 2009 Aug; 20 (15): 3552-60) identifican el primer dominio de propulsor de LRP6 como un nuevo dominio regulador de la unión de DKK1 a LRP6 y muestran que se puede usar un anticuerpo monoclonal contra este dominio para modular esta interacción.

Sumario de la invención

La invención proporciona anticuerpos contra LRP6 (por ejemplo, monovalentes, bivalentes) y procedimientos para

producir anticuerpos contra LRP6 que inhiben la ruta de señalización de Wnt canónica. Los anticuerpos contra LRP6 de la invención se unen al dominio 1 de propulsor β y bloquean las Wnt dependientes del propulsor 1, tales como Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt9, Wnt10A, Wnt10B. La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que los anticuerpos contra LRP6 diferencian los ligandos de propulsor 1 y propulsor 3 en dos clases separadas y se unen a epítomos distintos del objetivo LRP6. Además de los ligandos de Wnt, se espera que los anticuerpos contra el propulsor 1 de LRP6 inhiban la interacción con otros ligandos de unión al propulsor 1 (por ejemplo, esclerostina, Dkk1).

Específicamente, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento del mismo frente una proteína 6 relacionada con lipoproteínas de baja densidad (LRP6), en el que dicho anticuerpo o fragmento (i) se une a la región propulsora 1 de LRP6, (ii) inhibe específicamente la señalización de Wnt dependiente del propulsor 1 y (iii) tiene una constante de velocidad de disociación (K_D) de menos de 5×10^{-9} M, DETERMINADA usando resonancia de plasmón superficial, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 1; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 2; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 3; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 4; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 6, en el que el anticuerpo o fragmento es monovalente o bivalente.

La invención también se refiere al uso de este anticuerpo o fragmento como medicamento o en el tratamiento de un cáncer que expresa LRP6.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende este anticuerpo o fragmento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención también se refiere a una composición que comprende este anticuerpo o fragmento para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa LRP6 en un sujeto.

En realizaciones específicas, la invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada idéntica a la SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera idéntica a la SEC ID NO: 13. La invención también se refiere a un vector que comprende dicho ácido nucleico.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que muestra la determinación mediante FACS de la CE_{50} de Fab seleccionados en células PA1, células U266 y células Daudi, y los correspondientes datos de expresión de ARNm (A) e inactivación de LRP6 por ARNhc y los correspondientes datos B de expresión de ARNm;

Las Figuras 2A-L son gráficos que muestran la actividad de fragmentos Fab anti-LRP6 en células HEK HEK293T/17 (ensayo de genes indicadores) que expresan ligandos de Wnt1 o Wnt3A. Los datos muestran que los Fab anti-LRP6 bloquean selectivamente la señalización Wnt1 o Wnt3;

La Figura 3 muestra los valores de reactividad cruzada de anticuerpos frente al propulsor β 1 y al propulsor β 3 anti-LRP6 3 para humanos, ratones y monos cinomolgos;

La Figura 4 es un gráfico que muestra la expresión transitoria de diversos ligandos de WNT en células HEK293T/17 STF (ensayo de genes indicadores) y tratamiento con anticuerpos anti-LRP6, que muestra la inhibición de la actividad de WNT particulares basados en la unión/bloqueo de anticuerpos a regiones propulsoras β específicas de LRP6;

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra que la conversión de Fab a IgG da como resultado la potenciación de la señal del ligando de Wnt no bloqueado;

La Figura 6 es una transferencia Western que muestra la inhibición selectiva del objetivo de LRP6 en sistemas celulares;

La Figura 7 es un gráfico que muestra una sola dosis i.v. de un anticuerpo contra LRP6 que se une a la región propulsora β 1 a 5 mg/kg en un roedor;

La Figura 8A es una tabla que muestra genes en tumores MMTV-Wnt1 que fueron regulados por aumento > 2 veces en relación con el control $t = 0$ con un valor P ajustado de $< 0,01$ y la Figura 8B es una tabla que muestra genes que fueron regulados por disminución > 2 veces en relación con el control $t = 0$ con un valor P ajustado de $< 0,01$ 8 horas después de la administración de una dosis única de MOR08168 (5 mg/kg) a ratones portadores de tumores MMTV-Wnt1;

La Figura 9A es un gráfico que muestra mAb contra el propulsor 1, pero no contra el propulsor 3, provoca la regresión tumoral *in vivo* en el modelo MMTV-Wnt1. La Figura 9B es un gráfico que muestra el efecto de diferentes dosis del mAb contra el propulsor 1 sobre el crecimiento del modelo de tumor MMTV-Wnt1;

- 5 La Figura 10 es un gráfico que muestra que los mAb contra el propulsor 3 pero no contra el propulsor 1, provocan la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo MMTV-Wnt3;

La Figura 11 es un gráfico que muestra que los mAb contra el propulsor 3 pero no contra el propulsor 1 provocan la inhibición de la actividad Super Top Flash inducida por Wnt3A en células PA-1 *in vivo*;

- 10 La Figura 12 es una figura que muestra regiones protegidas con disolvente de LRP6 PD3-4 por MOR06475 por HDx MS (A) y que las mutaciones de residuos específicos dan como resultado la pérdida de unión de scFv MOR06475 (B);

- 15 La Figura 13 es un esquema que muestra las regiones propulsoras β de LRP6;

La Figura 14 es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que muestra que todas las moléculas de scFv se expresaron y purificaron con éxito a partir de *E. coli*;

- 20 La Figura 15 A-D es un ejemplo esquemático de anticuerpos multivalentes. (15A) scFv scFv unido al extremo C-terminal de la IgG completa (15B) scFv scFv unido al extremo N-terminal de Fc (15C) scFv scFv unido al extremo C-terminal de Fc (15D) scFv scFv unido a los extremos N y C terminal de Fc;

- 25 La Figura 16 es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que muestra el scFv de IgG anti-LRP6 biparatópico purificado en condiciones no reductoras (calle 1) y reductoras (calle 2);

La Figura 17 muestra la actividad en el ensayo de STF de un anticuerpo biparatópico y las partes componentes respectivas por separado;

- 30 La Figura 18 muestra la actividad en el ensayo de STF de las comparaciones de la longitud del enlazador en las moléculas de scFv;

La Figura 19 es una tabla que muestra la actividad de unión a un anticuerpo biparatópico;

- 35 La Figura 20 muestra la actividad de un anticuerpo biparatópico y un anticuerpo Prop3 pero no un anticuerpo Prop1 en un modelo de cocultivo de células L PA-1/Wnt3a;

La Figura 21 es un gráfico que muestra una comparación entre dosis i.v. de un anticuerpo contra Prop1 de LRP6 y un anticuerpo biparatópico contra Prop1/3 a 5 mg/kg en un roedor;

- 40 La Figura 22 es un gráfico que muestra que los anticuerpos tanto contra el propulsor 1 como biparatópicos contra los propulsores 1/3 causan la regresión tumoral *in vivo* en el modelo;

- 45 La Figura 23 es un gráfico que muestra la relación dosis-respuesta de un anticuerpo biparatópico de unión a Prop1/3 en el modelo;

La Figura 24 muestra que la diferenciación de tumores mamarios murinos es inducida por anticuerpos antagonistas contra LRP6. A-B) Se implantaron fragmentos de tumores MMTV-Wnt1 por vía subcutánea en ratones atímicos. Los ratones portadores de tumores se trataron con una dosis única de PBS (control) o 5 mg/kg de scFv MOR081681gGILALA 6475. A) Imágenes representativas de la tinción con rojo oleoso O para lípidos. B) Cuantificación de la tinción con rojo oleoso O. El gráfico representa los valores de la media $\pm$ SEM. n = 4 en el grupo de 72 horas, n = 3 en el grupo de 24 horas, n = 2 en el grupo de 5 días y n = 1 para PBS (control);

- 50 La Figura 25 es un gráfico que muestra la actividad del anticuerpo biparatópico de unión a Prop1/3 en el modelo de xenoinjerto de MDA-MB231 negativo para E-Cadherina;

- La Figura 26 muestra la afinidad y la cinética de unión de scFv MOR08168, MOR06475 y MOR08168IgGILALA 6475 contra PD1/2 y PD3/4 de LRP6 recombinante. A) Tabla resumen de las afinidades y las tasas de activación/desactivación determinadas mediante el análisis Biacore. B) Curvas de unión representativas de las moléculas anti-LRP6 para los dominios correspondientes del receptor de LRP6, PD1/2 y PD3/4. C) Unión secuencial de LRP6 PD1/2 y PD3/4 a scfv MOR08168IgG1LALA 6475;

- 60 La Figura 27 muestra un dibujo esquemático de anticuerpos biparatópicos basados en IgG;

La Figura 28 son fotografías de geles de SDS-PAGE que muestran la optimización de la expresión de scFv anti-LRP6 en *E. coli*;

La Figura 29 es una tabla que muestra el efecto de mutaciones únicas en ScFv MOR06475 en Tm;

La Figura 30 es una tabla que muestra el efecto de mutaciones únicas en ScFv MOR08168 en Tm;

La Figura 31 es una tabla que muestra el efecto de mutaciones dobles en ScFv MOR08168 sobre Tm en material expresado en sistemas tanto bacterianos como de mamíferos;

La Figura 32 es una tabla que resume las actividades de unión y funcionales de versiones de tipo salvaje y con mutaciones únicas/dobles de ScFv de MOR06475 y MOR08168s en ELISA, afinidad de Proteon y ensayos de gen indicador STF;

La Figura 33 es una ilustración de ejemplos seleccionados de las mutaciones diseñadas. En todas las figuras, la cadena principal de la proteína se representa en un diagrama de cinta, mientras que las cadenas laterales seleccionadas se representan como barras. (a): en el modelo de homología de scFv6475, VH:I37 está cerca de dos residuos aromáticos, que eran VL:F98 y VH:W103. (b) En el mutante VH:I37F de scFv6475, VH:F37 y VH: W103 podría formar una interacción de apilamiento pi-pi perpendicular, mientras que VH: F37 y VL: F98 podrían formar otra interacción de apilamiento de pi-pi perpendicular. (c) En el modelo de homología de scFv8168, el residuo hidrófobo VH: V33 está cerca de un residuo polar VH: N100a. (d) En el mutante VH: V33N de scFv8168, la cadena lateral VH: N33 podría formar un enlace de hidrógeno con VH: N100a, sugerido por la modelización de homología. El enlace de hidrógeno entre los dos residuos se ilustra mediante un enlace. (e): En el modelo de homología de scFv8168, el residuo cargado VH: K43 no formó un puente de sal con el residuo hidrófobo VH: V85. (f): Las dos cadenas laterales cargadas de VH: K43 y VH: E85 podrían formar un puente de sal debido a la mutación VH: V85E en scFv8168. La distancia entre los dos grupos de carga podría ser 2-61 Å; y

La Figura 34 es una tabla que muestra mediciones de termoestabilidad de los anticuerpos biparatómicos.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

La frase "respuesta inmunitaria" tal, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas y complemento) que da como resultado un daño selectivo, destrucción o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

La frase "vía de transducción de señal" o "actividad de señalización", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una relación causal bioquímica generalmente iniciada por una interacción proteína-proteína, tal como unión de un factor de crecimiento a un receptor, que da como resultado la transmisión de una señal de una parte de una célula a otra parte de una célula. Para LRP6, la transmisión implica la fosforilación específica de uno o más residuos de tirosina, serina o treonina en una o más proteínas en la serie de reacciones que provocan la transducción de señales. Los penúltimos procesos típicamente incluyen acontecimientos nucleares, lo que da como resultado un cambio en la expresión génica.

La frase "vía de señalización Wnt", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la vía Wnt canónica en la que los miembros de la familia Wnt de ligandos proteicos secretados se unen a un complejo receptor de LRP y Frizzled (FZD), permitiendo que la β -catenina se traslade al núcleo, interaccione con los factores de transcripción LEF/TCF y active la expresión del gen diana. La vía de señalización Wnt puede medirse usando un ensayo de gen indicador Wnt u otra medida de señalización dirigida a Wnt (por ejemplo, fosforilación de LRP6, estabilización de β -catenina y translocación nuclear, proliferación/supervivencia celular) como se describe en el presente documento.

La frase "vía de señalización Wnt1" se refiere a una vía Wnt canónica que se activa mediante la interacción de LRP6 con el ligando Wnt1 y la clase de ligandos de unión a Wnt1, tales como Wnt2, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt9a, Wnt10a o Wnt10b.

La frase "vía de señalización Wnt 3" se refiere a una vía Wnt canónica que se activa mediante la interacción de LRP6 con el ligando Wnt3 o Wnt3a.

El término LRP6 se refiere a LRP6 humana, tal como se define en el número de acceso NP002327.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos completos que interaccionan (por ejemplo, mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) con un epítipo de LRP6 e inhiben la transducción de señal. Un "anticuerpo" de origen natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden. FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunológico (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. El término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fv monocatenarios (scFv), Fv ligados a disulfuros (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de ambas partes de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales del sitio de unión al antígeno o del extremo amino del anticuerpo. El extremo N es una región variable y en el extremo C es una región constante; los dominios CH3 y CL en realidad comprenden el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

La frase "fragmento de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más partes de un anticuerpo que retiene la capacidad de interaccionar específicamente (por ejemplo, mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) con un epítipo LRP6 e inhibir la señal de transducción. Los ejemplos de fragmentos de unión incluyen, pero sin limitación, un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward y col., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de la complementariedad aislada (CDR).

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col., (1988) Science 242: 423-426; y Huston y col., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también están destinados a entrar dentro del término "fragmento de anticuerpo". Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los fragmentos de anticuerpos también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, (2005) Nature Biotechnology 23: 1126-1136). Los fragmentos de anticuerpos se pueden injertar en amazones basados en polipéptidos tales como fibronectina de tipo III (Fn3) (véase la patente de Estados Unidos n.º 6,703,199, que describe monocuerpos de polipéptidos de fibronectina).

Los fragmentos de anticuerpo se pueden incorporar en moléculas monocatenarias que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata y col., (1995) Protein Eng. 8: 1057-1062; y la patente de Estados Unidos n.º 5,641,870).

La expresión "anticuerpo multivalente" se refiere a una única molécula de unión con más de una valencia, en la que

"valencia" se describe como el número de restos de unión a antígeno presentes por molécula de una construcción de anticuerpo. Como tal, la molécula de unión única puede unirse a más de un sitio de unión en un receptor diana. Los ejemplos de anticuerpos multivalentes incluyen, pero sin limitación, anticuerpos bivalentes, anticuerpos trivalentes, anticuerpos tetravalentes, anticuerpos pentavalentes, y similares, así como anticuerpos biespecíficos y anticuerpos biparatópicos. Por ejemplo, para el receptor DE LRP6, el anticuerpo multivalente (por ejemplo, un anticuerpo biparatópico LRP6) tiene un resto de unión para el sitio de unión del dominio β -propulsor 1 y un resto de unión para el sitio de unión al dominio β -propulsor 3 De LRP6, respectivamente.

La expresión "anticuerpo multivalente" también se refiere a una molécula de unión única que tiene más de un resto de unión a antígeno para dos receptores diana separados. Por ejemplo, un anticuerpo que se une tanto a un receptor diana de LRP6 como a un segundo receptor diana que no es LRP6 (tal como ErbB, cmet, IGFR1, Smoothed, receptores Notch). En una realización, un anticuerpo multivalente es un anticuerpo tetravalente que tiene cuatro dominios de unión a receptor. Una molécula tetravalente puede ser biespecífica y bivalente para cada sitio de unión en ese receptor diana.

El anticuerpo multivalente media un efecto biológico (por ejemplo, que modula la activación celular (por ejemplo, uniéndose a un receptor de superficie celular y dando como resultado la transmisión o inhibición de una señal activadora o inhibidora), que da como resultado la muerte de la célula (por ejemplo, mediante la vía inducida por señal celular), o que modula una enfermedad o trastorno en un sujeto (por ejemplo, mediando o promoviendo la muerte celular, o modulando la cantidad de una sustancia que es biodisponible).

La expresión "anticuerpo monovalente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a un único epítipo en un receptor diana, tal como LRP6.

La expresión "anticuerpo bivalente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos en al menos dos receptores diana idénticos (por ejemplo, un anticuerpo que se une al dominio β -propulsor 1 de dos receptores LRP6, o un anticuerpo que se une al dominio β -propulsor 3 de dos receptores LRP6). El anticuerpo bivalente también puede reticular los receptores diana entre sí. Un "anticuerpo bivalente" también se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos diferentes en al menos dos receptores diana idénticos.

La expresión "anticuerpo biparatópico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos diferentes en el mismo receptor diana, por ejemplo, un anticuerpo que se une al dominio β -propulsor 1 y el dominio β -propulsor 3 de un único receptor de LRP6. El término también incluye un anticuerpo que se une tanto a los dominios de β -propulsor 1 como de β -propulsor 3 de al menos dos receptores LRP6.

La expresión "anticuerpo biespecífico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a dos o más epítopos diferentes en al menos dos receptores diana diferentes (por ejemplo, un receptor LRP6 y un receptor que no es un receptor LRP6).

La expresión "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a LRP6 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de LRP6). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a LRP6 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de LRP6 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Las frases "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se usan en el presente documento, se refieren a polipéptidos que incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, etc. que son sustancialmente idénticos a la secuencia de aminoácidos o derivan de la misma fuente genética. Este término también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

La frase "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de tales secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o anticuerpo que contiene secuencias marco de consenso derivadas del análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik, y col., (2000. J Mol Biol 296, 57-86). Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, CDR, se pueden definir usando esquemas de numeración bien conocidos, por ejemplo, el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia, o una combinación de Kabat y Chothia (véase, por ejemplo, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. (1991), eds. Kaba *et al*; A1 Lazikani y col., (1997) J. Mol. Bio. 273:927-948); Kabat *et al*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición., publicación del NIH n.º 91-3242 Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU.; Chothia y col., (1987) J.

Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia y col., (1989) Nature 342: 877-883; y Al-Lazikani y col., (1997) J. Mol. Biol. 273: 927-948.

Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*, o una sustitución conservadora para promover la estabilidad o la fabricación). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

La frase "anticuerpo monoclonal humano", tal como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR derivan de secuencias humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

La frase "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para los genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica corte y empalme de la totalidad o una parte de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El término "enlazador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un enlazador peptídico que consiste en residuos de glicina y serina usados para unir un scFv a una IgG. Un ejemplo de enlazador de Gly/Ser comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Ser)₂, es decir, (Gly₂ Ser)_n, donde n es un número entero positivo igual o mayor que 1. Por ejemplo, n = 1, n = 2, n = 3, n = 4, n = 5 y n = 6, n = 7, n = 8, n = 9 y n = 10. En una realización, los enlazadores incluyen, pero sin limitaciones, (Gly₄ Ser)₄ o (Gly₄ Ser)₃. En otra realización, los ligandos restos Glu y Lys se intercalan dentro de los enlazadores Gly-Ser para una mejor solubilidad. En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly₂Ser), (GlySer) o (Gly₃Ser). En otra realización, los enlazadores incluyen combinaciones y múltiplos de (Gly₃Ser) + (Gly₄Ser) + (GlySer). En otra realización, Ser puede reemplazarse por Ala, por ejemplo, (Gly₄Ala) o (Gly₃Ala). En otra realización, el enlazador comprende cualquier combinación de Gly, Ser y Pro. En otra realización más, el enlazador comprende el motivo (GluAlaAlaAlaLys)_n, donde n es un número entero positivo igual o mayor que 1.

El término "región Fc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende CH3, CH2 y al menos una parte de la región bisagra de un dominio constante de un anticuerpo. Opcionalmente, una región Fc puede incluir un dominio CH4, presente en algunas clases de anticuerpos. Una región Fc puede comprender toda la región bisagra de un dominio constante de un anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender alteraciones o modificaciones de uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o del dominio de la región constante de la cadena ligera (CL). Las modificaciones de ejemplo incluyen adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Dichos cambios pueden incluirse para optimizar la función efectora, la semivida, etc.

La expresión "sitio de unión", tal como se usa en el presente documento, comprende un área en un receptor diana al que se une selectivamente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, los sitios de unión en LRP6 incluyen el dominio de unión al propulsor $\beta 1$, el dominio de unión al propulsor $\beta 2$, dominio de unión al propulsor $\beta 3$ y el dominio de unión al propulsor $\beta 4$.

El término "epítipo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier determinante capaz de unirse con alta afinidad a una inmunoglobulina. Un epítipo es una región de un antígeno que está unido por un anticuerpo dirigido específicamente a ese antígeno, y cuando el antígeno es una proteína, incluye aminoácidos específicos que entran en contacto directo con el anticuerpo. Muy a menudo, los epítipos residen en las proteínas, pero en algunos casos, pueden residir en otros tipos de moléculas, como los ácidos nucleicos. Los determinantes del epítipo pueden incluir agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de

azúcares, grupos fosforilo o sulfonilo, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas.

Generalmente, los anticuerpos específicos para un antígeno diana particular se unirán a un epítipo en el antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

Las regiones de un polipéptido dado que incluyen un epítipo se pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols en Methods in Molecular Biology, vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando al mismo tiempo un gran número de péptidos en soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía están unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la materia y se describen en, por ejemplo, La patente de Estados Unidos n.º 4,708,871; Geysen y col., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8: 3998-4002; Geysen y col., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 82: 78-182; Geysen y col., (1986) Mol. Immunol. 23: 709-715. De forma similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de los aminoácidos, tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, citado anteriormente. Las regiones antigénicas de las proteínas también pueden identificarse utilizando gráficos estándar de antigenicidad e hidropatía, tales como los calculados usando, por ejemplo, el programa de software Omiga versión 1.0 disponible de Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el procedimiento Hopp/Woods, Hopp y col., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; para determinar los perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte y col., (1982) J.Mol. Biol. 157: 105-132; para los gráficos de hidropatía.

La expresión "unión específica" entre dos entidades significa una unión con una constante de equilibrio (K_A) (K_{on}/K_{off}) de al menos $10^2 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^2 M^{-1}$, al menos $10^3 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^3 M^{-1}$, al menos $10^4 M^{-1}$ al menos $5 \times 10^4 M^{-1}$, al menos $10^5 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 M^{-1}$, al menos $10^6 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 M^{-1}$, al menos $10^7 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 M^{-1}$, al menos $10^8 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^8 M^{-1}$, al menos $10^9 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^9 M^{-1}$, al menos $10^{10} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{10} M^{-1}$, al menos $10^{11} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{11} M^{-1}$, al menos $10^{12} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{12} M^{-1}$, al menos $10^{13} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{13} M^{-1}$, al menos $10^{14} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{14} M^{-1}$, al menos $10^{15} M^{-1}$, o al menos $5 \times 10^{15} M^{-1}$.

La frase "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra LRP6) se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de un antígeno afín (por ejemplo, una LRP6 humana) en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Además de la constante de equilibrio (K_A) indicada anteriormente, un anticuerpo contra LRP6 de la invención típicamente también tiene una constante de velocidad de disociación (K_D) (K_{off}/K_{on}) de menos de 5×10^{-9} , por ejemplo, menos de $10^{-9} M$, menos de $5 \times 10^{-10} M$, menos de $10^{-10} M$, menos de $5 \times 10^{-11} M$, menos de $10^{-11} M$, menos de $5 \times 10^{-12} M$, menos de $10^{-12} M$, menos de $5 \times 10^{-13} M$, menos de $10^{-13} M$, menos de $5 \times 10^{-14} M$, menos de $10^{-14} M$, menos de $5 \times 10^{-15} M$, o menos de $10^{-15} M$ o menor.

El término " K_{asoc} " o " K_a ", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " K_{dis} " o " K_d " tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término " K_D ", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene de la relación de K_d y K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para los anticuerpos se pueden determinar usando procedimientos bien establecidos en la materia. Un procedimiento para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón superficial o usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

El término "afinidad", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del "brazo" del anticuerpo interacciona a través de fuerzas débiles no covalentes con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad.

El término "avidez", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una medida informativa de la estabilidad global o la fuerza del complejo anticuerpo-antígeno. Está controlado por tres factores principales:

La afinidad del epítipo del anticuerpo; la valencia tanto del antígeno como del anticuerpo; y la disposición estructural de las partes que interaccionan. En última instancia, estos factores definen la especificidad del anticuerpo, es decir, la probabilidad de que el anticuerpo particular se una a un epítipo de antígeno preciso.

La frase "anticuerpo antagonista", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une con LRP6 e inhibe la actividad biológica de la señalización Wnt canónica, por ejemplo, reduce, disminuye y/o inhibe la actividad de señalización inducida por LRP6 en un ensayo de gen indicador Wnt o un ensayo de fosfo LRP6. Los ejemplos de ensayos se describen con más detalle en los ejemplos a continuación. En algunas realizaciones, los anticuerpos reducen, disminuyen o inhiben la actividad inducida por LRP6 medida en un ensayo de gen indicador Wnt a Cl_{50} de 10 nM o menos, 1 nM o menos, o 100 pM o menos, 10 pM, 1 pM, 0.5 pM, 0.1 pM. En algunas

realizaciones, las actividades de los anticuerpos pueden medirse mediante la unión a LRP6 usando SET, ELISA, FACS, Scatchard a una Cl_{50} de 10 nM o menos, 1 nM o menos, 0.5 pM, o 100 pM o menos. En una realización, la Cl_{50} es inferior a 300 μ M (0,3 pM). En otra realización, la Cl_{50} es igual a 300 μ M (0,3pM).

- 5 El término "Wnt1", tal, tal como se usa en el presente documento, se refiere a Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt9a, Wnt10a, o Wnt10b.

El término "Wnt 3a", tal como se usa en el presente documento, se refiere a Wnt3a y Wnt3.

- 10 El término "potenciar", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso mediante el cual la señal de Wnt se activa y mejora tras la conversión de un fragmento de un anticuerpo en un anticuerpo IgG contra LRP6 de longitud completa en presencia de un ligando de Wnt.

- 15 La expresión "potenciación no significativa" o "evita la potenciación" se refiere a una señal de Wnt que no está activada o potenciada en comparación con un anticuerpo de control o fragmento del mismo que se une al mismo epítipo. Ausencia de potenciación significativa puede ser al menos un 10 % menor que el anticuerpo control o fragmento del mismo, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 % menos que el anticuerpo de control o fragmento del mismo.

- 20 El término "grupo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína que reúne o agrupa a los receptores LRP6 y potencia la señalización Wnt. Los ejemplos de tales proteínas incluyen, pero sin limitaciones, ligandos de Wnt1, ligandos de Wnt3a y ligandos de Wnt3. Estas proteínas pueden causar multimerización, por ejemplo, dimerización de dos receptores endógenos de LRP6. Esta dimerización puede dar como resultado un
25 aumento de la avidéz debido al aumento de las interacciones de LRP6, que en presencia de un ligando de Wnt puede potenciar una señal de Wnt.

- 30 La frase "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a LRP6 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de LRP6). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a LRP6 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

- 35 La frase "variante modificada conservadoramente" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como a secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas conservadoramente se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos
40 funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservadoramente. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente invención que codifica un polipéptido también
45 describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que habitualmente es el único codón para metionina, y TGG, que habitualmente es el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

- 50 Para las secuencias polipeptídicas, las "variantes modificadas conservadoramente" incluyen sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia polipeptídica que da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la materia. Tales variantes conservadoramente modificadas son, además de, y no excluyen, variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos. Los
55 siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras para uno aher: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, Creighton, Proteins (1984)). En algunas realizaciones, la expresión "modificaciones de secuencia conservadora" se usa para referirse a modificaciones de aminoácidos que
60 no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

- Los términos "bloqueo cruzado", "bloqueado cruzado" y "bloqueo cruzado" se usan indistintamente en el presente documento para indicar la capacidad de un anticuerpo u otro agente aglutinante para interferir con la unión de otros anticuerpos o agentes aglutinantes a LRP6 en un ensayo estándar de unión competitiva.

La capacidad o el grado en que un anticuerpo u otro agente de unión es capaz de interferir con la unión de otro anticuerpo o molécula de unión a LRP6 y, por lo tanto, si puede decirse que se produce bloqueo cruzado, puede determinarse usando ensayos de unión competitiva estándar. Un ensayo adecuado implica el uso de la tecnología Biacore (por ejemplo, utilizando el instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia)), que puede medir el alcance de las interacciones utilizando la tecnología de resonancia de plasmón superficial. Otro ensayo para medir el bloqueo cruzado utiliza un enfoque basado en ELISA.

El término "optimizado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos que se ha alterado para codificar una secuencia de aminoácidos usando codones que se prefieren en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia*, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada se modifica por ingeniería genética para retener por completo o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como secuencia "parental".

En la técnica se conocen ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia LRP6 de diversas especies, que incluyen, por ejemplo, ELISA, transferencia Western y RIA. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos también puede evaluarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como análisis Biacore o afinidad relativa de FACS (Scatchard). Los ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos sobre las propiedades funcionales de LRP6 (por ejemplo, ensayos de unión a receptores, modulando la ruta Wnt) se describen con más detalle en los Ejemplos.

Por consiguiente, un anticuerpo que "inhibe" una o más de estas propiedades funcionales de LRP6 (por ejemplo, actividades bioquímicas, inmunoquímicas, celulares, fisiológicas u otras biológicas, o similares) según se determina de acuerdo con metodologías conocidas en la materia y descritas aquí, será entendido que se refiere a una disminución estadísticamente significativa en la actividad particular con respecto a la observada en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando está presente un anticuerpo de control de especificidad irrelevante). Un anticuerpo que inhibe la actividad de LRP6 efectúa tal disminución estadísticamente significativa en al menos 10 % del parámetro medido, en al menos 50 %, 80 % o 90 %, y en ciertas realizaciones un anticuerpo de la invención puede inhibir más de 95 %, 98 % o 99 % de la actividad funcional de LRP6.

Las frases "porcentaje idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, 60 % de identidad, opcionalmente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad en una región específica o, cuando no se especifica, en toda la secuencia), cuando se compara y alinea para correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe en una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferentemente en una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, a la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencia luego calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye referencia a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas óptimamente. Los procedimientos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Mates. 2: 482c, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (consulte, por ejemplo, Brent y col., (2003) Current Protocols in Molecular Biology).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la

similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col., (1977) Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402; y Altschul y col., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de puntuación alta (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valores positivos T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras del vecindario (Altschul) *et al, citado anteriormente*) Estos aciertos de palabra de vecindad iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Los puntajes acumulados se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos coincidentes, siempre > 0) y N (puntaje de penalización para residuos que no coinciden, siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el puntaje de alineación acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; el puntaje acumulado va a cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787) Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferentemente menor que aproximadamente 0,01, y lo más preferentemente menor que aproximadamente 0.001.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17 (1988)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) Algoritmo que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Aparte del porcentaje de identidad de secuencia indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo cruzado con los anticuerpos producidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como descrito abajo. De este modo, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Otra indicación más de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden usarse para amplificar la secuencia.

La frase "ácido nucleico" se usa en el presente documento indistintamente con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y a sus polímeros en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de cadena principal modificados, que son sintéticos, de origen natural y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a los del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, quimilmetilfosfonatos, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzner y col., (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka y col., (1985) J. Biol. Chem. 260: 2605-2608; y Rossolini y col., (1994) Mol. Cell. Probes 8: 91-98).

La frase "unida operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos o más polinucleótidos (por ejemplo, ADN) segmentos. Típicamente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está operativamente unida a una secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción del promotor que están operativamente unidas a una secuencia transcrita son físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, ellos están actuando en cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción, tales como potenciadores, no necesitan estar físicamente contiguas o localizadas muy cerca de las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente de la misma.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indique lo contrario, los términos "paciente" o "sujeto" se usan aquí indistintamente.

La expresión "agente anticanceroso" significa cualquier agente que se puede usar para tratar un trastorno proliferativo celular tal como cáncer, que incluye agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, radioterapia y agentes radioterapéuticos, agentes dirigidos contra el cáncer y agentes inmunoterapéuticos.

"Tumor" se refiere al crecimiento y la proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

El término "actividad antitumoral" significa una reducción en la tasa de proliferación, viabilidad o actividad metastásica de las células tumorales. Una posible forma de mostrar la actividad antitumoral es mostrar una disminución en la tasa de crecimiento de las células anormales que surge durante la terapia o tumor estabilidad o reducción de tamaño. Dicha actividad puede evaluarse usando modelos tumorales aceptados *in vitro* o *in vivo*, que incluyen, pero sin limitaciones, modelos de xenoinjerto, modelos de aloinjerto, modelos de MMTV y otros modelos conocidos en la materia para investigar la actividad antitumoral.

El término "malignidad" se refiere a un tumor no benigno o un cáncer. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" incluye una malignidad caracterizada por crecimiento celular desregulado o no controlado. Cánceres de ejemplo incluyen: carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas. El término "cáncer" incluye tumores malignos primarios (por ejemplo, Aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto que no sean el sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (por ejemplo, Aquellos que surgen de metástasis, la migración de células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

Varios aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes secciones y subsecciones.

LRP6 y la vía de señalización de Wnt

La invención se refiere a anticuerpos contra LRP6 y a usos de los mismos. La inhibición de la señalización Wnt por moléculas dirigidas a LRP6 conduce a una pérdida de señalización Wnt canónica. Por lo tanto, el antagonismo de la función del receptor LRP6 con un anticuerpo inhibirá la señalización de Wnt y ayudará en enfermedades asociadas con la señalización de Wnt canónica, por ejemplo, cáncer. En particular, los anticuerpos contra LRP6 pueden aumentar o disminuir específicamente la señalización mediada por las proteínas de clase Wnt1 o Wnt3a en diferentes situaciones de enfermedad.

La regulación alterada de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina se ha relacionado con diversas enfermedades humanas, como el cáncer y los trastornos óseos. Las moléculas que restablecen el equilibrio de la señalización de Wnt en estas enfermedades podrían tener potencial terapéutico. Utilizando la selección basada en fagos, se han identificado anticuerpos contra LRP6 que inhiben o mejoran la señalización de Wnt. Sorprendentemente, se han identificado dos clases de anticuerpos antagonistas de LRP6. Una clase de anticuerpos inhibe específicamente las proteínas Wnt representadas por Wnt1, mientras que la segunda clase inhibe específicamente las proteínas Wnt representadas por Wnt3a. Los experimentos de mapeo de epítopos indican que los anticuerpos contra LRP6 específicos de Wnt1 y específicos de Wnt3a se unen a la primera hélice y la tercera hélice de LRP6 respectivamente, lo que sugiere que las proteínas Wnt1 y Wnt3a se unen a diferentes hélices de LRP6 (véase WO 2009/056634). La caracterización adicional del dominio Propulsor 3 de LRP6 identificó residuos en este dominio responsables de la interacción con los anticuerpos. Los sitios de unión a anticuerpos dentro de la región YWTD-EGF de Propulsor 3 se identificaron usando una espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDx) y

corresponden a una superficie cóncava entre las palas 1 y 6 del dominio Propulsor 3.

La vía de señalización de Wnt es importante en el desarrollo embrionario y el mantenimiento del tejido postnatal. Esto se logra dirigiendo un conjunto específico de genes que controlan la regulación temporal y espacial del crecimiento celular, el movimiento y la supervivencia celular (revisado en Barker y Clevers (2006) *Nature Rev.* 5:997) La regulación apropiada de esta vía es importante para mantener la homeostasis tisular. La activación crónica de esta vía promueve el crecimiento y la supervivencia celular descontrolados y, en consecuencia, puede impulsar el desarrollo de enfermedades proliferativas celulares, como el cáncer. Alternativamente, la inhibición anormal de esta ruta puede dar como resultado muchos estados de enfermedad, por ejemplo, pérdida de masa ósea y otras enfermedades óseas. Las proteínas Wnt inician la señalización aguas abajo al interactuar con un receptor Frizzled y uno de los receptores de la superficie celular, que son miembros de las proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR): LRP5 y LRP6 (revisado en He y col., (2004) *Development* 31: 1663-1677).

El papel de LRP6 en la señalización Wnt canónica se descubrió a través de estudios genéticos. Los ratones mutantes que carecen de LRP6 exhibieron fenotipos compuestos similares a las mutaciones en varios genes Wnt individuales (Pinson y col., (2000) *Nature* 407: 535-538) En embriones de *Xenopus*, LRP6 dominante negativo bloquea la señalización por varias proteínas Wnt, mientras que la sobreexpresión de LRP6 activa la señalización de Wnt/ β -catenina (Tamai y col., (2000) *Nature* 407: 530-535) Además, se ha demostrado que la expresión de LRP6 o LRP5 es necesaria para que las células respondan a la señalización Wnt canónica (revisada en He y col., *citado anteriormente*, 2004).

LRP5 y LRP6 son altamente homólogos y comparten el 73 % y el 64 % de identidad en sus dominios extra e intracelulares, respectivamente. Se expresan ampliamente durante la embriogénesis y en tejidos adultos y comparten cierta redundancia funcional.

Los dominios extracelulares de LRP5 y LRP6 comprenden tres dominios básicos: 1) una región de propulsor β de tipo YWTD (tirosina, triptófano, treonina, ácido aspártico), 2) un dominio similar a EGF (factor de crecimiento epidérmico) y 3) un LDLR tipo A (LA) dominio.

La región de propulsores β de tipo YWTD contiene seis repeticiones YWTD de 43-50 residuos de aminoácidos cada una y forma una estructura de propulsores β de seis palas. En LRP5 y LRP6, hay cuatro regiones de propulsor β de tipo YWTD que están seguidas cada una por un dominio de tipo EGF, que comprende aproximadamente 40 residuos de aminoácidos con residuos de cisteína conservados, que a su vez están seguidos por tres dominios de LA. (Springer y col., (1998) *J. Mol. Biol.* 283: 837-862; Jeon y col., (2001) *Nat. Struct. Biol.* 8: 499-504) Los dominios de tipo β -propulsor-EGF pueden unirse a ligandos extracelulares. El dominio extracelular de LRP6 está definido por los residuos de aminoácido 19 a 1246 y contiene cuatro dominios de propulsor β en los residuos de aminoácidos 43-324, 352-627, 654-929 y 957-1250, que corresponden a las regiones de propulsor β 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Los dominios de propulsor 1-2 incluyen los aminoácidos 19-629, y los dominios de propulsor 3-4 incluyen los aminoácidos 631-1246.

Anticuerpos contra LRP6

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana, LRP6 de cinomolgo, LRP6 de ratón, y LRP6 de rata). La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que las proteínas Wnt capaces de activar la señalización de β -catenina se pueden dividir en dos clases y requieren diferentes hélices de LRP6 para la señalización tal como se describe en WO 2009/056634. Además, los anticuerpos contra LRP6 dímeros/bivalentes (por ejemplo, IgG) sensibilizan fuertemente las células a la señalización de Wnt, por ejemplo a través de la dimerización de LRP6 endógena. Estos resultados sugieren que Propulsor 1 y Propulsor 3 son requeridos diferencialmente para la actividad de señalización de Wnt1 y Wnt 3. Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre la activación de LRP6 inducida por Wnt y allanan el camino para el desarrollo de anticuerpos contra LRP6 para modular la señalización Wnt en diferentes enfermedades. La conversión de fragmentos de los anticuerpos contra LRP6 (por ejemplo, Fab) en un formato de IgG da como resultado un anticuerpo que agrupa receptores de LRP6 y en presencia de una proteína de ligando puede potenciar una señal de Wnt.

Algunos de los anticuerpos descritos en el presente documento potencian una señal de Wnt. En tal realización, la señal Wnt se activa y se potencia tras la conversión de un fragmento de un anticuerpo en un anticuerpo IgG LRP6 de longitud completa en presencia de un ligando Wnt. Por ejemplo, un Fab Wnt 1 se une a la región Propulsor 1 del receptor LRP6 y bloquea la vía Wnt 1 en ausencia de un ligando Wnt, por ejemplo, Wnt 3. En presencia de un ligando Wnt, por ejemplo, Wnt 3, Wnt 1 Fab bloquea la señalización a través de la vía Wnt 1, pero la activación de la señal puede ocurrir a través de la vía Wnt 3, produciendo así una señal. Cuando el Wnt 1 Fab se convierte en una Wnt 1 IgG de longitud completa, Wnt 1 IgG se une a las regiones Propulsor 1 de dos receptores LRP6 y bloquea la vía Wnt 1, sin embargo, en presencia de un ligando Wnt, por ejemplo, Wnt 3; la activación de señal ocurre a través de la vía Wnt 3 y también se mejora. Aunque no se requiere proporcionar una teoría de la acción, un posible mecanismo es que la IgG agrupa dos o más receptores LRP6 uniéndose a las regiones Propulsor 1 de cada receptor LRP6, lo que en presencia de un ligando Wnt 3 da como resultado una señal más fuerte a través de la vía

Wnt 3. La dimerización de los receptores LRP6 promueve la señalización de Wnt, quizás a través de la afección incrementada de las diversas interacciones que implican a LRP6.

Los resultados inversos se obtienen con un Fab Wnt 3 que se une a la región Propulsor 3 del receptor LRP6 y bloquea la ruta Wnt 3. En presencia de un ligando Wnt 1, el Fab Wnt 3 bloquea la vía Wnt 3, pero activa la ruta Wnt 1 para generar una señal. Cuando el Wnt 3 Fab se convierte en un Wnt 3 IgG de longitud completa, el Wnt 3 IgG se une a las regiones Propulsor 3 de dos receptores LRP6, y en presencia de un ligando Wnt 1, inhibe la señalización a través de la vía Wnt 1. Algunos anticuerpos evitan potenciar una señal Wnt. Otros anticuerpos se unen tanto a humanos como a cinomolgos LRP6.

Algunos de los anticuerpos contra LRP6 descritos en el presente documento son anticuerpos antagonistas. Otros anticuerpos contra LRP6 descritos en el presente documento son anticuerpos agonísticos.

Como diferentes proteínas Wnt requieren diferentes hélices de LRP6 para la señalización y debido a que la agrupación o dimerización de LRP6 potencia la señalización de Wnt, la terapia que usa los anticuerpos contra LRP6 puede regularse usando diferentes combinaciones de anticuerpos.

En una realización, los anticuerpos contra LRP6 se usan como anticuerpos monoméricos o fragmentos de los mismos, tales como anticuerpos monocatenarios, anticuerpos y similares. En una realización, se usa un anticuerpo monomérico LRP6 que se une a la región Propulsor 1 de LRP6 en combinación con un anticuerpo monomérico LRP6 que se une a la región Propulsor 3 de LRP6. En otra realización, los anticuerpos contra LRP6 se usan como anticuerpos multiméricos o fragmentos de los mismos, tales como anticuerpos biproteicos biparatómicos de LRP6.

Además de los ligandos de Wnt, se espera que los anticuerpos de Propulsor 1 de LRP6 inhiban la interacción con otros ligandos de unión de Propulsor 1 (por ejemplo, esclerostina, Dkk1). De forma similar, se espera que los anticuerpos Propulsor 3 inhiban la interacción con otros ligandos que se unen a el propulsor 3 (por ejemplo, Dkk1). Además, se puede esperar que los anticuerpos de unión a el propulsor 1 y 3 afecten a la actividad de otros moduladores de señalización de Wnt, p. R-espondinas.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 de ser humano y/o de cinomolgo), comprendiendo los anticuerpos una VH CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las VH CDR enumeradas en la Tabla 1, más adelante. En particular, la divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de cinomolgo, comprendiendo los anticuerpos (o alternativamente, que consisten en) una, dos, tres, cuatro, cinco o más CDR VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR VH enumeradas en la Tabla 1, *infra*.

La presente divulgación también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican VH, VL, la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, humano y/o cinomolgo LRP6). Dichas secuencias de ácido nucleico pueden optimizarse para la expresión en células de mamífero (por ejemplo, la Tabla 1 para MOR08168, MOR08545 y MOR06706 para anticuerpos de propulsor β 1 y MOR06475, MOR08193 y MOR08473 para anticuerpos de propulsor β 3).

Los anticuerpos contra LRP6 descritos en el presente documento, se unen a distintas regiones de propulsores β de LRP6. Los anticuerpos del propulsor 1 se unen al dominio del propulsor β y bloquean Wnts dependientes del propulsor 1 tales como Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt9, Wnt10A, Wnt10B. Los anticuerpos Propulsor 3 se unen al dominio β -propulsor 3y bloquean los Wnts dependientes de Propulsor 3 tales como Wnt3a y Wnt3.

Tabla 1: Ejemplos de anticuerpos contra LRP6

SEQ ID NUMBER	Región de Ab	Secuencia
MOR08168 Prop1		
SEQ ID ND: 1 (Kabat)	HCDR1	DYVIN
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	GISWSGVNTHYADSVKG
SEQ ID ND: 3 (Kabat)	HCDR3	LGATANNIRYKFMOV
SEQ ID ND: 4 (Kabat)	LCDR1	SGDSLNRNKVY
SEQ ID ND: 5 (Kabat)	LCDR2	KNNRPS
SEQ ID NO: 6 (Kabat)	LCDR3	QSYDGQKSLV
SEQ ID ND: 7 (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID ND: 8	HCDR2	SWSGVN

SEQ ID NUMBER	Región de Ab	Secuencia
MOR08168 Prop1		
(Chothia)		
SEQ ID NO: 9 (Chothia)	HCDR3	LGATANNIRYKFMDV
SEQ ID ND: 10 (Chothia)	LCDR1	DSL RNK
SEQ ID ND: 11 (Chothia)	LCDR2	KN
SEQ ID NO: 12 (Chothia)	LCDR3	VDGQKSL
SEQ ID No:13	VL	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRNKVYVYQQKPGQAPVLIYKNNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQA EDEADYQCQSYDGQKSLVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:14	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPGKLEWVSGISWGSVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:15	ADN VL	GATATCGAAGTACCCAGCCGCTTCACTGAGCGTTGCAACAGGTCAGACCGCGCTATCTCGTGTAGCGGC GATTCTCTTCGTAATAAGGTTTATTGTTACAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGATTTATAAGA ATAATCGTCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCACCTGACCATAG CGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATGCGAGTCTTATGATGGTCAGAAGTCTCTGTGTTGGC GGCGGCACGAAGTTAACGTCCTA
SEQ ID NO:16	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTGAAAGCGGCGGCGCTGGTGCAACCGGGCGGCGAGCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC CTCCGATTACCTTTTCTGATTATGTTATTAATTGGTGCGCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCGGATTTCTTGGTCTGGTGTAACTCATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCTTTTACCATTTACAGTGAT AATTCGAAAAACCCCTGATCTGCAAAATGAACAGCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGGCG GTCTTGGTGCTACTGCTAATAATATCTGTTATAAGTTTATGGATGTTTGGGGCAAGGCACCTGGTGACGGT
		TAGCTCA
SEQ ID NO:17	ligera Lambda	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRNKVYVYQQKPGQAPVLIYKNNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQA EDEADYQCQSYDGQKSLVFGGGTKLTVLGPAAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:18	Pesada IgG1 LALA	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPGKLEWVSGISWGSVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKTSGGTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHCTPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCQVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

SEQ ID NUMBER	Región de Ab	Secuencia
MOR08168 Prop1		
SEQ ID NO: 19	ADN Light Lambda	GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACCAAGGTCAGACCGCGCTATCTCTGTAGCGGC GATTCTCTTCGTAATAAGGTTTATTGGTACAGCAGAAACCCGGGAGGCGCCAGTTCTTGATTTATAAGA ATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCTGACCATTAG CGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATGCCAGTCTTATGATGGTCAGAAGTCTCTGTGTTGGC GGCGGCACGAAGTTAACCGTCTAGGTACGCCAAGGCTGCCCCCTCGGTACTCTGTTCGCCGCCCTCTCTG AGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGG CCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCTCCAACAAGCAACAAC AAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAG GTCACGCATGAAGGGAGCACCTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA
SEQ ID NO: 20	ADN pesado IgG1 LALA	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGGCGGCTGGTGCAACCAGGCGGCAAGCTGCTGAGCTGCGCGGC CTCCGGATTACCTTTTCTGATTATGTTATTAATTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCGGTATTTCTGGTCTGGTGTAACTCATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCTTTTACCATTTCAGTGAT AATTGAAAAACCCCTGTATCTGCAATGAACAGCGTGCCTGCGGAAGATACGGCGTGTATTATTGCGCGC GTCTTGTGTCTACTGCTAATAATATTCGTTATAAGTTATGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACGGT TAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGTGTCTGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCTGGTGACCG TGCCCTCAGCAGCTTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAAGCAACCAAGGTGG ACAAGAGAGTTGAGCCCAAACTTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCGG GGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGG TGCTAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTCTCAC GTCTGCAACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAGGCCCTCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAAGCCGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTC CTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGGACAAGAAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
MDR08545 Prop1		
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	HCDR1	VNGMH
SEQ ID NO: 22 (Kabat)	HCDR2	VIDGMGHTYYADSVKG
SEQ ID NO: 23 (Kabat)	HCDR3	YOYIKYGAFDP
SEQ ID NO: 24 (Kabat)	LCDR1	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 25 (Kabat)	LDCR2	GDSNRPS
SEQ ID NO: 26 (Kabat)	LCDR3	TRTSTPISGV
SEQ ID NO: 27 (Chothia)	HCDR1	GFTFSVN
SEQ ID ND: 28 (Chothia)	HCDR2	DGMGH
SEQ ID NO: 29 (Chothia)	HCDR3	VDYIKYGAFDP
SEQ ID NO: 30 (Chothia)	LCDR1	DNIGSKY

MDR08545 Prop1		
SEQ ID ND: 31 (Chothia)	LDCR2	GDS
SEQ ID NO: 32 (Chothia)	LCDR3	TSTPTSG
SEQ ID ND:33	VL	DIELTPPSVSVPQTARISCSGDNIGSKYVHWYQKPGQAPVLVIYGDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAEDEADYYCTRTSTPISGVFGGGLTLVL
SEQ ID NO:34	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVNGMHVVRQAPGKLEWVSVIDGMGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDYIKYGAFDPWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:35	VL de la línea germinal	SYELTPPSVSVPQTASITCSGDNIGSKYVHWYQKPGQSPVLVIYGDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAMDEADYYCTRTSTPISGVFGGGLTLVL
SEQ ID ND:36	VH de la línea germinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVNGMHVVRQAPGKLEWVSVIDGMGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDYIKYGAFDPWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:37	ADN VL	GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACAGGTCAGACCGCGCTATCTCGTGACGGC GATAATATTGTTCTAAGTATGTTCAATGTAACGAGCAGAAACCGGGCAGGCGCCAGTCTTGTGATTATG GTGATTCTAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTACGCGATCCAAACAGCGGCAACACCGCGACCTGAC CATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCACTGCTACTCTACTCTATTCTGGTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTT
SEQ ID ND:38	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGCTGGTGCAACCGGGCGGCAAGCTGCTGAGCTGCGCGGC CTCCGGATTACCTTTCTGTTAATGGTATGCAATGGGTGCGCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCGTTATTGATGGTATGGGTCACTTATTATGCTGATCTGTTAAGGGTCTTTACCATTTACGTGATAA TTCGAAAAACCCCTGATCTGCAATGAACAGCTGCGTGCGGAAGATACGCGCGTGTATTATTGCGCGCGT TATGATTATTAAGTATGGTCTTTGATCCTTGGGGCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA
SEQ ID ND:39	Lambda ligera	DIELTPPSVSVPQTARISCSGDNIGSKYVHWYQKPGQAPVLVIYGDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAEDEADYYCTRTSTPISGVFGGGLTLVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTPSKQSNKKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEA
SEQ ID ND:40	Fab pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVNGMHVVRQAPGKLEWVSVIDGMGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDYIKYGAFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

MDR08545 Prop1		
SEQ ID NO:41	ADN lambda ligera	GATATCGAACTGACCCAGCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTGACACCGCGCTATCTCGTGTAGCGGC GATAATATTGGTTCTAAGTATGTTCAATTGGTACAGCAGAAACCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTTGATTATG GTGATTCTAATCGTCCCTCAGGCATCCGGAAACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCGTGAC CATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCACTCGTACTTCTACTCCTATTTCTGGTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCCTTCTGGCCAGCCGAAAGCCGACCGAGTGTGACGCTGTTTCCGCCGA GCAGCGAAGAATTGCAGGCGAAACAAAGCGACCTGGTGTGCTGATTAGCGACTTTTATCCGGAGCCGTGA CAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCTCCAAACAAAGC AACAAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCACAGAAGCTACAGC
		TGCCAGGTACGCTAGAGGGGAGCACCCGTGAAAAAACCGTTGCGCCGACTGAGGCC
SEQ ID ND:42	ADN Fab pesada	CAGGTGCAATTGTTGAAAGCGGCGGCGCTGTGCAACCGGCGGCGAGCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC CTCCGGATTACCTTTCTGTTAATGGTATGCTTGGGTGCGCCAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCGTTATTGATGGTATGGGTCACTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCTTTTACCATTTACAGTGATAA TTCGAAAAACCCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCT TATGATTATTAAGTATGGTCTTTTATCCTTGGGGCCAAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCAGCGTGA CCAAAGGTCCAAGCGTGTTCCTGCTGCTCCGAGCAGCAAAAGCACAGCGGCGGCACGCTGCCCTGGGCT GCCTGGTTAAAGATTATTTCCCGGAACAGTCACCGTGAGCTGGAACAGCGGGGCGCTGACCGCGGCTGC ATACCTTTCCGGCGGTGCTGCAAGCAGCGGCGCTGTATAGCCTGAGCAGCGTTGTGACCGTGCCGAGCAGCA GCTTAGGCACTCAGACCTATTTGCAACGTGAACATAAACCGAGCAACCAAGTGGATAAAAAAGTGG AACCGAAAAAGC
SEQ ID NO:43	VL de la línea germinal	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNIGSKYVHWYQKPGQAPVLVIYGDNSNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRA QAGDEADYYCTRTSTPISGVFGGKLTVL
SEQ ID NO:44	VH de la línea germinal	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVNGMHWVRQAPGKGLEWVSVIDGMGHYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDYIKYGAFDPWVGQGLTVVSS
SEQ ID NO:45	ADN VL de la línea germinal	AGCTATGAACTGACCCAGCCGCTGTCTGTGAGCGTGGCGCTGGGCCAGACCGCGCTATTACCTGCGGTGGC GATAACATTGGCAGCAAAATATGTGATTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCTGCTGGTATTAT GGCGATAGCAACCGTCCGAGCGGCATTCCGGAACGTTTTAGCGGAGCAACAGCGGCAACACCGGACCCCTG ACCAITTTCTGCGCGCAGGCGGGTGATGAAGCGGATTATTATTGCACCGTACCAGCACCCGATTAGCGGC GTGTTTGGCGGCGGTACGAAGTTAACCGTCTT
SEQ ID NO:46	ADN VH de la línea germinal	GAGGTGCAATTGCTGGAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGCGGCGAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC CTCCGGATTACCTTTCTGTTAATGGTATGCTTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCGTTATTGATGGTATGGGTCACTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCTTTTACCATTTACAGTGATAA TTCGAAAAACCCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCT TATGATTATTAAGTATGGTCTTTTATGCTTGGGGCCAAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA
MOR06706 Prop1		

MOR06706 Prop1		
SEQ ID NO: 47 (Kabat)	HCDR1	DYAIH
SEQ ID NO: 48 (Kabat)	HCDR2	GISYSGSSTHYADSVKG
SEQ ID NO: 49 (Kabat)	HCDR3	GSHGNIMAKRVFDF
SEQ ID NO: 50 (Kabat)	LCDR1	SGDNIRKKYVY
SEQ ID NO: S1 (Kabat)	LDCR2	EDSKRPS
SEQ ID NO: 52 (Kabat)	LCDR3	STADSGINNGV
SEQ ID NO: 53 (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO: 54 (Chothia)	HCDR2	SYSGSS
SEQ ID NO: 55 (Chothia)	HCDR3	GSHGNIMAKRYFDF
SEQ ID NO: 56 (Chothia)	LCDR1	DNIRKKY
SEQ ID NO: 57 (Chothia)	LDCR2	EDS
SEQ ID NO: 58 (Chothia)	LCDR3	ADSGINNG
SEQ ID NO:59	VL	DIELTPPSVSAPGQTARISCSGDNIRKKYVYVYQKPGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AEDEADYYCSTADSGINNGVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:60	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAIHWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSSTHYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHGNIMAKRYFDFWGQGLTVTVSS
SEQ ID ND:61	VL De la línea germinal	SYELTPPSVSVPGQTASITCSGDNIRKKYVYVYQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AMDEADYYCSTADSGINNGVFGGGTKLTVL
SEQ ID ND:62	VH De la línea germinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAIHWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSSTHYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHGNIMAKRYFDFWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:63	ADN VL	GATATCGAACTGACCCAGCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAAGTCAGACCGCGCGTATCTCGTGATAGCGGC GATAATATTCGTAAGAAGTATGTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTAATTTATG AGGATTCTAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGGACCTGA CCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTACTGCTGATTCTGGTATTAATAATGG TGTGTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTT

MOR06706 Prop1		
SEQ ID NO:64	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTACCTTTCTGATTATGCTATTCAATGGGTGCGCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTTATTCTGGTAGCTCTACCCATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTACCAITTCACGTGATAATTGAAAAACCCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCAGGAAGATACGGCGGTATTATTGCGCGCTGGTTCTCATGGTAATATTATGGCTAAGCGTTATTTGATTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
SEQ ID NO:65	Lambda ligera	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIRK KYVYVYQKPGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSTADSGINNGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:66	IgG1 LALA pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAIHWVRQAPGKLEWVSGISYSGSSSTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHGNIMAKRYDFWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPFVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHQSLSLSPGK
SEQ ID NO:67	ADN lamda pesada	GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTGAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGC GATAATATTCGTAAGAAGTATGTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTCTTGATTATGAGGATTCTAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAACAGCGGCAACCCGCGAACCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTGCTCTACTGCTGATTCTGGTATTAATAATGGTGTTGTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCCACTGGTGTGCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCAACACCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGAGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCAAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCACAGAATGTTCA
SEQ ID NO:68	ADN IgG1 LALA pesada	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTACCTTTCTGATTATGCTATTCAATGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTTATTCTGGTAGCTCTACCCATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTACCAITTCACGTGATAATTGAAAAACCCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCAGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCTGGTTCTCATGGTAATATTATGGCCAAGCGTTATTTGATTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC

MOR06706 Prop1		
		GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGACACCTTCCC GGCTGCTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACTCACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTCTCACCGTCC TGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCG AGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCGCCGAGAGAACCACTACAAGACACGCTCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTCTCT TCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG
MOR06475 Prop3		
SEQ ID NO: 69 (Kabat)	HCDR1	NRGGGVG
SEQ ID NO: 70 (Kabat)	HCDR2	WIDWDDOKSYSTSLKT
SEQ ID NO: 71 (Kabat)	HCDR3	MHLPLVFDS
SEQ ID NO: 72 (Kabat)	LCDR1	RASQFIGSRYLA
SEQ ID NO: 73 (Kabat)	LDCR2	GASNRAT
SEQ ID NO: 74 (Kabat)	LCDR3	QYYDYPQT
SEQ ID NO: 75 (Chothia)	HCDR1	GFSLSNRGG
SEQ ID NO: 76 (Chothia)	HCDR2	DWDDD
SEQ ID NO: 77 (Chothia)	HCDR3	MHLPLVFDS
SEQ ID NO: 78 (Chothia)	LCDR1	SQFIGSRY
SEQ ID NO: 79 (Chothia)	LDCR2	GAS
SEQ ID NO: 80 (Chothia)	LCDR3	YYDYPQ
SEQ ID NO:81	VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFATYYCQYYDYPQTFGQGTKEIK
SEQ ID NO:82	VH	QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSNRGGGVGWIRQPPGKALEWLAWIOWDDOKSYSTSLKTRLTISKDTS KNQVVLTMNMDPVDATYYCARMHLPLVFDSWGQGLTVVSS
SEQ ID NO:83	ADN VL	

MOR06475 Prop3		
		GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGCGGACCTGAGCCTGTCTCCGGCGAACGTGCGACCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTTTATTGGTTCTCGTTATCTGGCTTGGTACCAAGCAAAACAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAA TTTATGGTGCTCTAATCGTCAACTGGGGTCCCGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGCGACGGATTTCAC CCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGACTTATTATTGCCAGCAGTATTATGATTACTCTCAGA
		CCTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAA
SEQ ID NO:84	ADN VH	CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGCCCGGCCCTGGTGAAACCGACCCAAACCTGACCTGACCTGTACCTTTT CCGGATTAGCCTGTCTAATCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGATTGCGCAGCGCGCTGGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTGGATCGATTGGGATGATGATAAGTCTTAGCAACAGCCTGAAAACGCGCTGACCATTAGCA AAGATACTTCGAAAAATCAGGTGGTGTGCTGACTATGACCAACATGACCCGGTGATACGGCCACCTATTATTG CGCGGTATGCATCTTCTCTTGTITTGATTCTTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA
SEQ ID NO:85	Kappa ligero	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFISRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFATYYCQYYDYPQTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEHKHYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:86	Pesada IgG1 LALA	QVQLKESGPAIVKPTQTLTLCTFSGFSLNRGGGVGWIRQPPGKALEWLAWIDWDQDYSYSTSLKTRLTISKDTIS KNQVVLMTNMDPVDATYYCARMHLPLVFDWVGQGLVTVSSASTKGPVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRVEPKSCDKHTT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEVESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:87	ADN Light kappa	GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGCGGACCTGAGCCTGTCTCCGGCGAACGTGCGACCTGAGCTGCAGAG GCGAGCCAGTTTATTGGTTCTCGTTATCTGGCTTGGTACCAAGCAAAACAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAA TTTATGGTGCTCTAATCGTCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTCAC CCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGACTTATTATTGCCAGCAGTATTATGATTATCCTCAGA CCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTCACGGTGGCTGCACCATCTGTCTCTCTCTCCGCCATCT GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTGTGTGCTGCTGAATACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAG TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
SEQ ID NO:88	ADN pesado IgG1 LALA	

[illegible]

MOR08193 Prop3		
SEQ ID NO: 98 (Kabat)	LCDR3	QQYWSIPIT
SEQ ID ND: 99 (Chothia)	HCDR1	GFSLSNRGG
SEQ ID ND: 100 (Chothia)	HCDR2	DWDDD
SEQ ID NO: 101 (Chothia)	HCDR3	MHLPLVFD
SEQ ID ND: 102 (Chothia)	LCDR1	SQFIGSRY
SEQ ID NO: 103 (Chothia)	LDCR2	GAS
SEQ ID ND: 104 (Chothia)	LCDR3	YWSIPI
SEQ ID NO:105	VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYCQQYWSIPITFGQGTKVEIK
SEQ ID ND:106	VH	QVQLKESGPALVKPTQLTLTCTFSGLSNRGGGVGWIRQPPGKALEWLAWIDWDDDKSYSTSLKTRLTISKDTS KNQVVLTMNMDPVDATYYCARMHLPLVFD\$WGGTGLVTVSS
SEQ ID NO:107	VL De la línea germinal	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISL PEDFAVYYCQQYWSIPITFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:108	VH De la línea germinal	QVTLKESGPALVKPTQLTLTCTFSGLSNRGGGVGWIRQPPGKALEWLAWIDWDDDKSYSTSLKTRLTISKDTS KNQVVLTMNMDPVDATYYCARMHLPLVFD\$WGGTGLVTVSS
SEQ ID NO:109	ADN VL	GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCCTGAGCCTGTCTCCGGCGAACGTGCGACCCCTGAGCTGCAGA GCGAGCCAGTTTATTGGTCTCGTTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACAGGTCAAGCACCCTGCTATTAA TTTATGGTGCTTCTAATCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTAC CCTGACCATIAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTCGGGTATTATTGCCAGCAGTATTGCTATTCTCTATTA
		CCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTA
SEQ ID NO:110	ADN VH	CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGCCCGCCCTGGTGAAACCGACCCAAACCTGACCTGACCTGTACCTTT CCGGATTAGCCTGTCTAATCGTGGTGGTGTGGGTTGGATTGCGCAGCCGCTGGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTTGGATCGATTGGGATGATGATAAGTCTTATAGCACCAGCCTGAAACCGCTGCTGACCATTAGCA AAGATACTTGAAAAATCAGGTGGTGTGCTGACTATGACCAACATGGACCCGGTGATACGGCCACCTATTATTG CGCGGTATGCATCTTCTCTGTTTTGATTCTTGGGGCCAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA

MOR08193 Prop3		
SEQ ID ND:111	Kappa ligero	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSL EPEDFAVYYCQYWSIPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVFCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA
SEQ ID ND:112	Pesada Fab	QVQLKESGPAIVKPTQTLTLCTFSGFSLSNRGGGVGWIRQPPGKALEWLAWIDWDDKSYSTSLKRLTISKDTS KNQVVLMTNMDPVDATYYCARMHLPLVFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTRKDKKVEPKS
SEQ ID NO:113	ADN Light kappa	GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCTGAGCCTGTCTCCGGCGAACGTGCGACCTGAGCTGCAGA GCGAGCCAGTTTATTGGTTCTCGTTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCTCTATTAA TTTATGGTGCTTCTAATCTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTATAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTATAC CCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGTGTAATATTGCCAGCAGTATTGGTCTATTCTATTA CCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCTGCTCCGAGCGTGTTATTTTTCCGCCGAG CGATGAACAACCTGAAAAGCGGCACGGCGAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTTATCCCGCTGAAGCGAA AGTTCACTGGAAGTAGACAACCGCGCTGCAAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAACAGGATAGCA AAGATAGCACCTATTCTCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGCGGATTATGAAAAACATAAAGTGATGC GTGCGAAGTGACCCATCAAGGTCTGAGCAGCCCGTGACTAAATCTTTAATCTGTCGCGAGGCC
SEQ ID NO:114	ADN Pesada Fab	CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGCCCGCCCTGGTGAACCGACCCAAACCTGACCTGACCTGTACCTTTT CCGGATTAGCCTGTCTAATCGTGGTGGTGGTGTGGGTTGGATTCCGCCAGCCGCTGGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTTGGATCGATTGGGATGATGATAAGTCTTATAGCACCAGCCTGAAACGCGCTGACCATTAGCA AAGATACTTCGAAAAATCAGGTGGTGTGCTGACTATGACCAACATGGACCCGGTGGATACGGCCACCTATTATTG CGCGCGTATGCACTCTCTCTTTTGTATTCTTGGGGCCAAAGCACCTGGTGAACGTTAGCTCAGCGTCGA CCAAAGGTCAAGCGTGTTCCTGCTGCTCCGAGCAGCAAAAGCACAGCGGCGGCAAGGCTGCTGGGCT GCCTGGTTAAAGATTATTTCCCGAACCAGTCACCGTGAGCTGGAACAGCGGGCGCTGACCGAGCGGCTGC ATACCTTTCCGGCGGTGCTGCAAGCAGCGGCTGTATAGCTGAGCAGCGTTGTGACCGTGCCGAGCAGCA GCTTAGGCACTCAGACCTATTTTGCAACGTGAACATAAACCAGCAACACCAAGTGGATAAAAAAGTGG AACCGAAAAGC
MOR08473 Prop3		
SEQ ID ND: 115 (Kabat)	HCDR1	SYGMS
SEQ ID NO: 116 (Kabat)	HCDR2	NISNDGHYTYVADSVKG
SEQ ID ND: 117 (Kabat)	HCDR3	FQASYLDIMDY
SEQ ID NO: 118 (Kabat)	LCDR1	SGDNIGSKYVH
SEQ ID ND: 119 (Kabat)	LDCR2	NDSNRPS
SEQ ID ND: 120 (Kabat)	LCDR3	QAWGDNGTRV
SEQ ID NO: 121 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID ND: 122 (Chothia)	HCDR2	SNDGHY

MOR08473 Prop3		
SEQ ID NO: 123 (Chothia)	HCDR3	FQASVLDIMDY
SEQ ID NO: 124 (Chothia)	LCDR1	DNIGSKY
SEQ ID NO: 125 (Chothia)	LDCR2	NDS
SEQ ID NO: 126 (Chothia)	LCDR3	WGDNGTR
SEQ ID NO:127	VL	DIELTPPSVSVPQGSITISCSGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYNDNRPSPGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AEDEADYYCQAWGDNNGTRVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:128	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMWVRQAPGKGLEWVSNISNDGHYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFQASYLDIMDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:129	VL De la línea germinal	SYELTPPSVSVPQGTASITCSGDNIGSKYVHWYQQKPGQSPVLVIYNDNRPSPGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAMDEADYYCQAWGDNNGTRVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:130	VH De la línea germinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMWVRQAPGKGLEWVSNISNDGHYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFQASYLDIMDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:131	ADN VL	GATATCGAACTGACCCAGCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACAGGTCAGAGCATTACCATCTCGTGAGCGGCG ATAATATTGGTCTAAGTATGTTCAATTGGTACCAAGCAAAACCCGGGAGGCGCCAGTCTTGATTTATAAT GATTCTAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTAGCGGATCAACAGCGGCAACACCGCGACCTGACCA TTAGCGGCACTCAGCGGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGGCTTGGGGTGATAATGCTACTCGTGCT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACGTTCTT
SEQ ID NO:132	ADN VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC CTCCGGATTACCTTTCTTCTTATGGTATGCTTGGGTGCGCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCAATATTCTAATGATGGTCATTATCTTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCTTTTACCATTTACGCTGAT AATTCGAAAAACCCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGC GTTTTCAGGCTCTTATCTTGATATTATGATTATTGGGGCAAGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA
SEQ ID NO:133	Ligera lambda	DIELTPPSVSVPQGSITISCSGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYNDNRPSPGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AEDEADYYCQAWGDNNGTRVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEA
SEQ ID NO:134	Pesada Fab	

MOR08473 Prop3		
		QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKLEWVSNISNDGHYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARFQASYLDIMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
SEQ ID NO:135	ADN Ligera lambda	GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGAGCATTACCATCTCGTGTAGCGGCG ATAATATTGGTTCTAAGTATGTTTCATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGAGGCGCCAGTTCTTGATTATAAT GATTCTAATCGTCCCTCAGGCATCCCGAACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGGACCTGACCA TTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATGCCAGGCTTGGGGTATAATGGTACTCGTGTGT TTGGCGGCGGACGAAGTTAACGTTCTTGCCAGCCGAAAGCCGACCGAGTGTGACGCTGTTTCCGCCGA GCAGCGAAGAATTGACGGCGAACAAGCGACCTGCTGTGCTGATTAGCGACTTTTATCCGGGAGCCGTGA CAGTGGCTGGAAAGCAGATAGCAGCCCGTCAAGCGGGAGTGGAGACCACACACCTCCAAACAAAGC AACACAAAGTACGCGGCGACAGCTATCTGAGCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAAGTACAGC TGCCAGGTCACGCATGAGGGGAGCACCCTGGAAAAACCGTTGCGCCGACTGAGGCC
SEQ ID NO:136	ADN Pesada Fab	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGCGCTGGTGCAACCGGGCGGCGAGCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC CTCCGGATTACCTTTCTTCTTATGGTATGCTTGGGTGCGCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCAATATTCTAATGATGGTCATTATACTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTACCATTTACGTGAT AATTCGAAAAACCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGGGAAGATACGCGCTGTATTATGCGCGC GTTTTCAGGCTTCTATCTTGATATTATGGATTATTGGGGCAAGGACCCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCGTC GACCAAAGTCCAAGCGTGTTCGCTGCTCCGAGCAGCAAAAGCAGCGCGGCGACGCTGCCCTGG
		GCTGCTGGTTAAAGATTATTTCCCGGAACCAAGTCACCGTGAGCTGGAACAGCGGGGCGCTGACCAAGCGCG TGCTATACCTTTCCGCGGTGCTGCAAGCAGCGGCTGTATAGCTGAGCAGCGTTGTGACCGTGCCGAGCA GCAGCTTAGGCACTCAGACCTATATTTGCAACGTGAACCAATAACCGAGCAACACCAAGTGGATAAAAAAG TGGAACCGAAAAAGC
SEQ ID ND:137	VL De la línea germinal	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNIGSKYVHWYQKPGQAPVLIYNDNSNRPSGIPERFSGNSNGNTATLTISRA QAGDEADYQCAWGDNGTRVFGGGLKLYL
SEQ ID ND:138	VH De la línea germinal	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKLEWVSNISNDGHYTYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARFQASYLDIMDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:139	ADN VL De la línea germinal	AGCTATGAACTGACCCAGCGCTGAGTGTAGCGTTGCGCTGGGTGACACCGCGCGTATTACCTGCGCGGT GATAACATTGGCAGCAAAATATGTGATTGGTATCAGCAGAAACCGGCCAGGCGCGGTGCTGGTATTAT AACGATAGCAACCGTCCGAGCGGCAATCCGGAACGTTTATGCGGCAGCAACAGCGGCAATACCGCGACCTG ACCATTAGCGGTGCGCAGGCGGGTGATGAAGCGGATTATTATGCCAGGCGTGGGGCGATAATGGTACGCG TGTGTTTGGCGGTGATCAAGTTAACGTTCTT
SEQ ID ND:140	ADN VH De la línea germinal	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGCGCGGCGCTGGTGCAACCGGGCGGCGAGCTGCTGCTGAGCTGCGCGGC CTCCGGATTACCTTTCTTCTTATGGTATGCTTGGGTGCGCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCAATATTCTAATGATGGTCATTATACTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTACCATTTACGTGAT AATTCGAAAAACCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGGGAAGATACGCGCGTGTATTATGCGCGC GTTTTCAGGCTTCTATCTTGATATTATGGATTATTGGGGCAAGGACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Biparatópico MOR08168/MOR0647S		
SEQ ID ND:170	Ligera lambda MOR08168	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLNRKVVYVYQQKPGQAPVLIYKNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA EADADYCCQSYDGQKSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTTPSKQSNKNYAASVLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:171	Pesado MOR08168 hlgG1 LALA (sin K) ScFv MOR06475	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDDYINWVRQAPGKGLVWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMQVWVGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKHTCTPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGSGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRVLAWYQKPGQAPRLUIGACNRRATGVPARFSGSGSGT DFTLTISSELEPEFATYYCQYYDYPTFGQGTKEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLKESGPALVKPTQT LTLTCTFSGFSLNRGGGVGWIRQPPGKALEWLAWIDWDQKSYSTSLKRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVD TATYYCARMHLPLVFDSSWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:172	ADN pesado MOR08168 hlgG1 LALA (sin K) MOR0647S scFv	CAGGTGCAATTGGTCGAGCTGCGCGGAGGACTGGTG CAGCCTGGTGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGC CAGCGGCTTCACTTCAGCGACTACGTGATCAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGT GTCCGGCATCTCTGGTCTGGCGTGAAACCCCACTACGCCGACAGCGTGGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCTGTACTCTGACAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCCCGTGTACTACTG TGCCAGACTGGGCGCCACCGCAACAACATCCGGTACAAGTTTATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACACTGGT GACCGTCAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCGCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCTGTAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGG AGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCGCCGTGTCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGTCCAGCGTG GTGACAGTGCCAGCAGCAGCTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAGAGTGAGGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCCAGCCCGCAGA GGCAGCGGGCGGACCTCCGTGTCTCTGTTCCCGCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCG GAGGTGACTGCGTGTTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACTGGAGCGG CGTGGAGGTGCACAACGCCCAAGACCAAGCCAGAGAGGACGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCG TGCTGACCTGCTGTCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTGC CAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCAAGGTGTACACCTGCCCC CTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCAACCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACACTACAAGAACACCCCGCAGTGTGGACAGC GACGGCAGCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTCAGC
		TGCAGCGTGATGCACGAAGCGCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGCGGGCG TCCGGCGGAAGCGATATCTGTGCTGACACAGAGCCCTGCCACCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACC CTGAGCTGCCGGGCGACCGAGTTTATGCTGCTCCGCTACCTGGCTGGTATCAGAGAAAGCCCGACAGGCT CCAGACTGTGATCTACGGCGCCAGCAACAGAGCTACCGGCTGCCCGCCAGATTTCTGGCAGCGGCGAGC GGCACCAGCTTACCCCTGACCATCAGCAGCTTGAACCCGAGGACTTCGCCACTACTACTGCCAGCAGTACT ACGACTACCCCGAGACTTCGGCCAGGCGACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGGAGGCGGATCCGGGGGTGG CGAAAGTGGAGCGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCCAGGTGCAATTGAAGAAGTCCGGCCCTGCCCTG GTGAAGCCTACCCAGACCTGACCTGACATGCACCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGCAACAGAGGGCGGGA GTGGGCTGGATCAGACAGCCTCCCGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCTGGATCAGTGGGACGACGACAA GAGCTACAGCAGCCTGAAACCCGGCTGACCATCTCAAGGACACCAAGAACAGAGGTGGTGTCTCAC CATGACCAACATGGACCCCGTGGAACCGCCACTATTATGCGCCCGGATGCACTGCCCTGGTGTTCGAT AGCTGGGGCCAGGGAACCTGGTGACAGTGTCAGC
SEQ ID NO:173	Pesada MOR08168 hlgG1 LALA ScFv MOR06475 (DP a DA)	

Biparatópico MOR08168/MOR0647S		
		QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDDYINWVRQAPGKGLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMQVWVGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKGGSGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGSG TDFTLTSSLEPEDFATYYCQYYDYDYPQTFGQGTKEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLKESGPALVKPTQ TLTLCTFSGFSLNRGGVGWIRQPPGKALEWLAIDWDDKSYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDAV DTATYYCARMHLPLVFDWSWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:174	ADN pesado MOR08168 hlgG1 LALA ScFv MOR06475 (DP a DA)	CAGGTGCAATTGGTCGAGTCTGGCGGAGGACTGGTGACGCTGGTGCGAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGC CAGCGGCTTACCTTCAGCGACTACGTGATCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGT GTCCGGCATCTCTTGGTCTGGCGTGAAACACCACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCGAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCCGCGTACTACTG TGCCAGACTGGGCGCCACCGCAACAACATCCGGTACAAGTTCTGAGACTGTGTGGGCGCAGGGCACACTGGT GACCTGACGCTCAGTAGCACCAAGGGCCCGAGCGTGTTCCTCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCTGGTGAAGGACTACTCCCGAGCCCGTGACCTGTCTGGAACAGCGG AGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCGCGGTGCTGACAGAGAGCGGCCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTG GTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCAACCAAGCTACATCTGCAAGTGAAACCAAGCCAGCAACACC AAGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTCCCGCCCTGCGCCAGCCAG GGCAGCGGGCGGACCTCCGTGTCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCC GAGGTGACCTGCTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGAGCGG CGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCG TGCTGACCGTGTGCAACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCAACAAGGCCCTGC CAGCCCCATCGAAAAGACATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCCC CCTCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGCCGAGAACAACTACAAGACACCCCCCAGTGTGGACAGC GACGGGAGCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACCTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGACGCTGATGCACGAAGCGCTGCACAACCACTACACCAAGAGGCTGAGCCGTGTCCCCGCAAGGGC GGCTCCGGCGGAAGCGATATCTGTGCTGACACAGAGCCCTGCCACCTGTCTGTGAGCCCTGGCGAGAGAGCC ACCTGAGCTGCCGGGCCAGCCAGTTCACTGGCTCCCGTACTGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAG GCTCCAGACTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGAGCTACCGGGCTGCCCGCCAGATTTCTGGCAGCGG AGCGGACCGGACTTCACTGACATCAGCAGCTTGGAACCCAGAGGACTTCCGCACTACTGCTGACAGT ACTACGACTACCCAGACCTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGGAGGGGATCCGGGGGT GGCGGAAGTGGAGGCGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCCAGGTGCAATTGAAGAGTCCGGCCCTGCC CTGGTGAAGCCTACCCAGACCTGACCTGACATGCACCTTCAGCGCTTACGCTGAGCAACAGAGGGCGG GGAGTGGGCTGGATCAGACAGCCTCCGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGATCGACTGGGACGACGACA CAAGAGCTACAGCACCAGCTGAAAACCGGCTGACCATCTCAAGGACACAGCAAGAACAGGTGGTGTCT CACCATGACCAACATGGACGCGGTGGACACCGCCACCTATTATTGCGCCCGGATGCACTGCCCTGTGTTC GATAGCTGGGGCAGGGAACCTGGTGACAGTGTCCAGC
SEQ ID NO:175	Pesada MOR08168 hlgG1 LALA ScFv MOR06475 (DP a TA)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDDYINWVRQAPGKGLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMQVWVGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKGGSGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGSG
		TDFTLTSSLEPEDFATYYCQYYDYDYPQTFGQGTKEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLKESGPALVKPTQ TLTLCTFSGFSLNRGGVGWIRQPPGKALEWLAIDWDDKSYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMTAVD TATYYCARMHLPLVFDWSWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:176	ADN pesado MDR08168 hlgG1	

Biparatópico MOR08168/MOR0647S		
	LALA ScFv MOR06475 (DP a TA)	CAGGTGCAATTGGTCGAGTCTGGCGGAAGGACTGGTGCAGCCTGGTGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGC CAGCGGCTTCACTTCAGCGACTACGTGATCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGAAAGGGCTGGAATGGGT GTCCGGCATCTTGTGGCTGGCGTGAACACCCACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCAACATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCCTGTACTACTG TGCCAGACTGGGCGCCACCGCCAACAACATCCGGTACAAGTTCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACACTGGT GACCGTCACTCAGCTAGCACAAGGGCCCGAGCGTGTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCTGGTGAAGGACTACTCCCGAGCCCGTGAACCGTGTCTGGAAACAGCGG AGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCTGTCCAGCGTG GTGACAGTGGCCAGCAGCGCTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAACACAAGCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCAAAGAGTGGCACAAGACCCACACCTGCCCTGCGCCAGCCCGA GGCAGCGGGCGGACCTCCGTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGAGCCCG GAGGTGACCTGCGTGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACGACCTACAGGTTGGTGTCCG TGCTGACCGTGTGCAACGAGCTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCAACAAGGCCCTGC CAGCCCCATCGAAAAGACATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGCGGAGCCCGAGGTGTACACCTGCCCC CTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACACCCCCCAGTGTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGACAAAGTTCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACG TGACCGTGTGACGACGAAGCGCTGCACAACCACTACACCAAGAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAGGGC GGCTCCGGGGAAGCGATATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCCACCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCC ACCTGAGCTGCCGGCCAGCCAGTTCATCGGCTCCCGCTACCTGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAG GCTCCAGACTGCTGTATCAGCGCCAGCAACAGAGTACCGGCGTCCCGCCAGATTTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTTCACTTCACTCAGCATCAGCAGCCTGGAAACCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGT ACTACGACTACCCAGACCTTCCGCCAGGGCACCAGGTGGAGATCAAGGGCGGAGGGCGGATCCGGGGGT GGCGGAAGTGGAGGCGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCCAGGTGCAATTGAAGAGTCCGGCCCTGCC CTGGTGAAGCTACCCAGACCTGACCTGACATGCACCTTACGCGGCTTACGCTGAGCAACAGAGCGGCG GGAGTGGGCTGATCAGACAGCCTCCCGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCTGAGTCTGAGTGGGACGACGA CAAGAGCTACAGCACCAGCCTGAAAACCCGGCTGACCATCTCAAGGACACAGCAAGAACAGGTGGTGTCT CACCATGACCAACATGACCGCGTGGACACCGCCACCTATTATGCGCCCGGATGATCTGCCCTGTGTGTT GATAGCTGGGGCAGGGAACCTGGTGACAGTGTCCAGC
SEQ ID NO:177	Ligera ScFv MOR06475 MDR08168 lambda	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQKPGQAPRLIYGASNRAITGVPARFSGSGSDFTLTSSL EPEDFATYYCQYDYPQTFGQGTVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGQVQLKESGPAIVKPTQTTLTCTFS GFSLSNRGGVGWIRQPPKALEWLAVIDWDDKSYSTSLKRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAR MHLPLVFDWSWGQGLTVTVSSGGSGGSDIELTPPSVSVAPGQTARISGSDSLRNKYVWYQKPGQAPVLIYKN NRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDGQKSLVFGGGTKLTVLQPKAAPSVLTLPSPSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKNYAASVLSLTPEQWKSHRSYSQCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
SEQ ID NO:178	ADN Ught ScFv MOR06475 MOR08168 lambda	GATATCGTGTGACACAGAGCCCTGCCACCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCCGG GCCAGCCAGTTATCGGCTCCCGCTACCTGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCTCCAGACTGCTG ATCTACGGCGCCAGCAACAGGCTACCGGCTGCCCGCAGATTTCTGGCAGCGGACGCGCAGCAGCTTC ACCTGACCATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCACTACTACTGCCAGCAGTACTACGACTACCC AGACCTTCCGGCCAGGGCACCAGGTGGAGATCAAGGGCGGAGGCGGATCCGGGGGTGGCGGAAGTGGAG GCGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCCAGGTGCAATTGAAGAGTCCGGCCCTGCCCTGGTGAAGCCTAC CCAGACCTGACCTGACATGCACCTTACGCGGCTTACGCTGAGCAACAGAGGCGGCGGAGTGGGCTGGAT CAGACAGCCTCCGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCTGGATCGACTGGGACGACGACAAGAGCTACAGCA CCAGCCTGAAAACCCGCTGACCATCTCAAGGACACCAAGCAAGAACAGGTGGTGTCTACCATGACCAACA TGGAACCCGTGGACACCGCCACTATTATGGCGCCGGATGATCTGCCCTGTGGTTCGATAGCTGGGGCCA GGGAACCTGTGTGACAGTGTCCAGCGGCGGCTCCGGCGGAAGCGACATCGAGCTGACCCAGCCCCCTCTGT GTCTGTGGCGCCCGGGCAGACCGCCAGAAATCAGCTGCAGCGGCGACAGCTCGGGAACAAGGTGTACTGGT ATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCCGTGTGGTGTATCAAGAACAACCGGCCAGCGGCACTCCCTGAGC GGTTCAGCGGCGACCAACAGCGGCAATACCGCCACCTGACCATCAGCGGCAACCGGCGGAAGATGAGGCC GACTACTACTGCCAGCTACGACGGCCAGAAAAGCCTGGTGTTCGGCGGAGGCAACAGCTTACCGTGTCTG GGCCAGCCCAAAGCCGCCCTAGCGTGACCTGTTCCTCCCGCAGCAGCGAGGAAGTGCAGGCGCAACAAGGCC ACCTGGTCTGCTGATCAGCGACTTCTACCTGGCGCGTGACGTGGCCTGGAAGGCGGACAGCAGGCCCC GTGAAGGCGGCGTGGAGACAACACCCAGCAAGCAGAGCAACAAGTACGCCCGCAGCAGTACCT GAGCCTGACCCCGAGCAGTGAAGAGCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGTCAACCCAGGCGAGCAGCCG

Biparatópico MOR08168/MOR0647S		
		TGGAGAAAACCGTGGCCCCACCGAGTGCAGC
SEQ ID ND:179	VH MDR08168	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPGKLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDEVWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:180	ADN VH MDR08168	Caggtgcaattggtcgagtcgagcggaggactggctcagcctggggcagcctgagactgagctgcgcgcagcggcttcacctcagcgact acgtgatcaactgggtgcgacagccctggaaagggcctggaatgggtgctccggcactcttggctggcgtgaacacccactacgccgacag cgtgaaggccgggttcacctcagcgggacaacaagaacacccctgacctgcagatgaacagcctgagagccgaggacacccgctgt actactgtgccagactggggccactccaacaacatccggtaacagttcaggactgtggggccagggcacactggtagccctcagctca
SEQ ID NO:181	Pesado MOR08168 hlgG1 LALA	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPGKLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDEVWGQGLTVTVSSASTKGPVFLAPSSKTS5GGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHCTPCPAPEAAAGGSPVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEXTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC5VMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
SEQ ID NO:182	ADN pesado MOR08168 hlgG1 LALA	CAGGTGCAATTGTCGAGTCTGGCGGAGGACTGGTGACGCTGGTGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACGTGATCAACTGGGTGCGACAGGCCCTCGGAAGGGCCTGGAATGGGT GTCCGGCATCTCTGGTCTGGCGTGAACACCCACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCCGCTGTACTACTG TGCCAGACTGGGCGCCACCGCCCAACAACATCCGGTACAA GTTCATGACGTGTGGGGCCAGGGCACACTGGT GACCGTCAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAACAGCGG AGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGTCCAGCGTG GTGACAGTGCCCAAGCAGCAGCCTGGGCAACCAAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCCAAGCAACACC AAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGA GGCAGCGGGCGGACCTCCGTGTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCC GAGGTGACCTGCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCG TGCTGACCGTGCTGCAACAGGACTGGCTGAACGGAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGC CAGCCCCATCGAAAAGACATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCAAGGTGTACACCTGCCCC CTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACACCCCCAGTGTCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGACGCGTGTGACAGGCCCCCTGCACAACCTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCGGCAAG
SEQ ID NO:183	VL MOR06475	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRTGVPARFSGSGSGTDFTLTSSL EPEDFATYYCQQYDYPQTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:184	ADN VL MOR06475	

Biparatónico MOR08168/MOR0647S		
		Gatatcgtgctgacccagagcccgccgacccctgagcctgtctccggcgaacgtgogacccgagctgcagagcgagccagttatttggtctc gttatctggttggtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgctctattaatttatggcttctaactgctgcaactggggtccggcgcttttag cggctctggatccggcaggaatttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagacttgcgacttattattgcccagcagttattgattatcct cagacctttggccagggtacgaaagtgaaattaaa
SEQ ID NO:185	Ligera MOR06475 kappa	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRAITGVPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFATYYCQQYDYPQTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVKDNL QSGNSQESVTEQDSKDSVYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:286	ADN Light MOR06475 kappa	GATATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCGACCCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACCCCTGAGCTGCAGA GCGAGCCAGTTTATTGTTCTCGTTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACAGGTCAAGCACCGCGCTATTAA TTTATGGTGCTCTAATCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTAC CCTGACCATTAGCAGCTGGAACCTGAAGACTTTGCGACTTATTATGCCAGCAGTATTATGATTATCTCAGA CCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTATCTTCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGACCGCCAGCGTGGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCA AGGTGCASTGSAAGGTGACACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAG CAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
SEQ ID NO:187	MDR06475 pesado hlgG1LALA scFv MDR08168 (VH-3-VL)	QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSNRGGGVGWIRQPPGKALEWLAWIDWDDDKSYSTSLKTRLTISKDTS KNQVVLMTNMDPVDATYYCARMHLPLVFDWSGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVQVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWEŠNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDSRWQQGNVFSCVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSG GSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYINWVRQAPGKGLVWSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMVWVGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIELTQ PPSVSVAPGQTARISCSGDSLNRKVVYVYQQKPGQAPVLIYKNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEAD YYCQSYDQKSLVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:188	ADN pesado MOR06475 hlgG1LALA ScFv MOR08168 (VH-3- VL)	

Biparatópico MOR08168/MOR0647S		
		CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGCCCGGCCCTGGTGAACCGACCCAAACCTGACCTGACCTGTACCTTTT CCGGATTAGCTGTCTAATCGTGGTGGTGGTGGGTTGGATTGCGCCAGCCGCTGGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTTGGATCGATTGGGATGATGATAAGTCTTATAGCACCAGCCTGAAAACGCGTCTGACATTAGCA AAGATACTTCGAAAAATCAGGTGGTGTGCTGACTATGACCAACATGGACCCGGTGGATACGGCCACCTATTATTG CGCGCTATGCTCTTCTCTGTTTGTATTCTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCTCGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGGACAGCCGCCCTGGGCT GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCTCGCGCTGC ACACCTTCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGGCCGTGACAGCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCA GCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACCAAGTGGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCAGCCAGGCGAGCGGGCGGACCCCTC GTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCTGCTGGTG GTGGACGTGAGCCAGGACCCAGAGGTGAAGTTCACTGGTACGTGGAGCGGTGGAGGTGCACAACGC CAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCGAGGTGTACACCTGCCCTCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGCTGCTGACTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCGAGAACCACTACAAGACCCCCAGTGCTGAGACGCGACGGCAGCTTCTCTCTGT ACAGCAAGCTGACCTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTCAGCTGCAGCGTGATGCAGAA GCGCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCTGAGCTGTCCCGCGCAAGGGCGGCTCCGGCGGAAGCCA GGTTCAATTGGTTGAAAGCGGTGGTGTGTTGAGCTGCTGGTGTAGCCTGCGTGTGCAAGCAAG CGGTTTTACTTTAGCGATTATGTGATTAATTGGGTTGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGC GGTATTAGCTGGTCAGGTGTTAATACCAATTATGAGATAGCGTGAAGGTGCTTTTACCAATTAGCCGTGATA ATAGCAAAAATACCTGTATCTGAGATGAATAGCCTGCGTGAGAGATACCGCAGTTTATATTGTGACG TCTGGGTGCAACCGCAAATAATTCGCTATAAATTTATGGATGTGGGGTACAGGTACACTAGTTACCGTT AGCAGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGAYCTGGTGGCGGTGGCAGTGATCGAACTGACCAGCC TCCGAGCGTTAGCGTTGCACCGGGTCAGACCGCACGTATTAGCTGTAGCGGTGATAGTCTGCGTAATAAAGTT TATTGGTATCAGCAGAAACCGGGTCAGGCTCGGTTCTGGTTATTATAAAAATAATCGTCCGAGCGGTATT CGGAACGTTTTAGCGGTAGCAATAGCGGTAATACCGCAACCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCAGAAGATG AAGCCGATTATTATTGTGAGAGCTATGATGTCAGAAAAGCCTGGTTTTGTTGGTGGCACCAGGTTACCGT TCTG
SEQ ID NO:189	Pesada MDR0647S hlgG1 LALA ScFv MOR08168 (VH-4- VL)	QVQLKESGPAIVKPTQTLTLCTFSGFSLNRRGGVGVWIRQPPGKALEWLAWIDWDDKSYSLKTRLTISKDTS KNQVVLMTNMDPVDATYYCARMHLPLVDFDSWQGLTVTVSSASTKGPSVFLPSSKSTSGGTAALGLVKD YFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQYICNVNHNKPSNTKDKRVEPKSCDKHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEVESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGSG GSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPGKLEWVSGISWVSGVNTHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGS DIETQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRNKVYVYQQKPGQAPVLVIYKNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQA EDEADYYCQSYDQGKSLVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:190	ADN pesado MOR06475 hlgG1 LALA ScFv MOR08168 (VH-4- VL)	CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGCCCGGCCCTGGTGAACCGACCCAAACCTGACCTGACCTGTACCTTTT CCGGATTAGCTGTCTAATCGTGGTGGTGGTGGGTTGGATTGCGCCAGCCGCTGGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTTGGATCGATTGGGATGATGATAAGTCTTATAGCACCAGCCTGAAAACGCGTCTGACATTAGCA AAGATACTTCGAAAAATCAGGTGGTGTGCTGACTATGACCAACATGGACCCGGTGGATACGGCCACCTATTATTG CGCGCTATGCTCTCTCTGTGTTTGTATTCTTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCTCGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGGACAGCCGCCCTGGGCT GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGC ACACCTTCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCA GCCTGGGCACCTCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACCAAGTGGACAAGAGAGTG

Biparatópico MOR08168/MOR0647S		
		GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCTG6CCAGCCCCAGAGGCGAGCGGGCGGACCCTCC GTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTAGCTGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCA CAACGC CAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGTGTCACCA GGA CTGGCTGAACGCGAAGGAATACAAGTGCAGGCTCCAAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAAGCCAGGTGTACACCTGCCCCCTCCGGGAGGAGATGA C CAAGAACCAGGTGCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGA GCAACGCGCCAGCCGAGAACACTACAAGACCACCCCCAGTGCTGGACAGCGACGCGAGCTTCTCTCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGTGTCACGAA GCGCTGCACAACCTACTACCCAGAAGAGCTGAGCTGTCCCCCGCAAGGGCGCTCCGCGGGAAGCCA GGTTCAATTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTAGCTGTGGTGTAGCTGCTGTGAGCTGTGTCAGCAAG CGGTTTACCTTTAGCGATTATGTGATTAATTGGGTTCTCAGGCACCGGGTAAAGGCTGTGGAATGGGTTAGC GGTATTAGCTGGTCAAGTGTGTTAATACCCATTATGAGATAGCGTGAAAGGCTGTTTACCATTAGCCGTGATA ATAGCAAAAATACCTGTATCTGAGATGAATAGCTGCGTGCAGAAAGATACCGAGTTTATTATTGTGCACG TCTGGGTGCAACCGCAAATAATATTCGCTATAAAATTTATGGATGTGTGGGTGAGGGTACACTAGTTACCCTT AGCAGTGGTGGTGGTGTAGCGGTGGTGGCGATCTGGTGGCGGTGGTTAGGTGGTGGTGGCAGTGTATA TCGAACTGACCCAGCTCCGAGCGTTAGCGTTGCAACCGGGTCAAGCCGACGATTAAGCTGTAGCGGTGATA GTCTGCGTAATAAAGTTTATTGGTATCAGCAGAAACCGGGTCAAGGCTCCGTTCTGGTTATTTATAAAAAATA TCGTCCGAGCGGTATCCGGAACGTTTATGCGGTAGCAATAGCGGTAATACCGCAACCCGTACCATTAAGCGGC ACCCAGGCGAAGATGAAGCCGATTATTATGTGAGAGCTATGATGGTCAAGAAAGCGTGGTTTTGGTGGT GGCACCAAGCTTACCGTCTG
SEQ ID NO:191	VL MOR08168wt	DIETQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRNKVYVYQQKPGQAPVLIYKNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA EADADYYCQSYDQKSLVFGGKTLTVL
SEQ ID ND:192	ADN VL MDR08168 wt	GACATCGAGCTGACTCAGCCCCCTAGCGTGTCAAGTGGCTCCTGGCCAGACCGCTAGAATTAGCTGTAGCGGC GATAGCTGCGTAACAAGGTCTACTGGTATCAGCAGAAAGCCCGCCAGGCCCCCTGTGCTGGTCACTATAAG AACAATAGGCTAGCGGCATCCCCGAGCGGTTAGCGGCTCTAATAGCGGCAACACCGCTACCTGACTATT GCGGCACTCAGGCGAGGACGAGGCGGCTACTACTGTGAGTCTACGACGCGCAGAAAGTCACTGGTCTTTG GCGGCGGAAGTAAAGTACCGTGTG
SEQ ID ND:193	Light lambda MDR08168 wt	DIETQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRNKVYVYQQKPGQAPVLIYKNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA EADADYYCQSYDQKSLVFGGKTLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID ND:194	ADN Light lambda MOR08168 wt	GACATCGAGCTGACTCAGCCCCCTAGCGTGTCAAGTGGCTCCTGGCCAGACCGCTAGAATTAGCTGTAGCGGC GATAGCTGCGTAACAAGGTCTACTGGTATCAGCAGAAAGCCCGCCAGGCCCCCTGTGCTGGTCACTATAAG AACAATAGGCTAGCGGCATCCCCGAGCGGTTAGCGGCTCTAATAGCGGCAACACCGCTACCTGACTATT GCGGCACTCAGGCGAGGACGAGGCGGCTACTACTGTGAGTCTACGACGCGCAGAAAGTCACTGGTCTTTG GCGGCGGAAGTAAAGTCAAGCTGCTGGGACAGCTAAGGCTGCCCCAGCGTGACCTGTCTCCCCCAGCA GCGAGGAGTGTGAGGCCAACAGGCCACCTGGTGTGCTGATCAGCGACTTCTACCGAGCGCGGTGACCG TGGCTTGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGGTGGAGACCAACCCCCAGCAAGCAGAGCAAC AACAAATACGCGCCAGCAGCTACTGAGCTGACCCCGAGCAGTGAAGAGGCCACAGGCTCTACAGCTGC CAGGTGACCCACGAGGGCAGACCCGTGGAAAAGACCGTGCCCCAACCGAGTGCAGC
SEQ ID ND;195	Pesada MDR08168IgG 1LALA_6475sc Fv wt	

[illegible]

Biparatópico MOR08168/MOR0647S		
SEQ ID ND:199	Ligera lambda MOR08168 DI	SYELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRNKVYVYQQKPGQAPVLYKNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA EDEADYYCQSYDGGQKSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID ND:200	ADN Light lambda MORD8168 DI	TCTTACGAGCTGACCCAGCCCCCTCCGTGTCTGTGGCTCCTGGCCAGACGCCAGAAATCTCTGCTCCGGCGA CTCCCTGCGGAACAAGGTGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTGTGTGCTCATCTACAAGAA CAACCGGCCCTCCGGCATCCCCGAGAGATTCTCTGGCTCCAACTCCGGCAACACCGCCACCTGACAATCTCT GGCACACAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTGTCAGTCTACGACGGCCAGAAATCACTGGTGTTCGGC GGAGGCACCAAGCTGACAGTGTGGGACAGCCTAAGGCTGCCCCAGCGTGACCTGTTCCTCCCCAGCAGC GAGGAGCTGCAGGCCAACAAAGGCCACCTGGTGTGCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCGTGACCGTG GCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGAGACCAACACCCCAAGCAAGCAGAGCAACAA CAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCTGACCCCGAGCAGTGGAGAGCCACAGGCTCTACAGCTGCCA GGTGACCCACGAGGGCAGCACCCTGGAAAAGACCGTGGCCCAACCGAGTGACGC
SEQ ID NO:201	Pesado MOR08168IgG 1LALA_6475sc Fv DI	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPGKGLEWVSGISWVSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARLGATANIRYKFMVWVGQGLTVTVSSASTKGPSPFLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKGGSGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSRAAQFSGSRFLAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGG TDFLTLSLEPEDFATYYCQYDYDPQTFGQGTKEIKGGGSGGGSGGGGSGGGGSGVQLKESGPALVKPTQ TLTLCTFSGFSLNRGGVGWIRQPPGKALEWLAVIDWDDDKSYSTSLKRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCARMHLPLVFDWSWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:202	ADN pesado MOR08168IgG 1LALA_6475sc	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGAGGACTGGTCCAGCCTGGCGGATCACTTAGACTGAGCTGTGCCGC TAGTGGCTTCACCTTTAGCGACTATGTGATTAAGTGGTCCGACAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGT GTCAGGCATTAGTTGAGCGCGCTGAACACTACTACCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCATTATAGCCG
	Fv DI	

Biparatópico MOR08168/MOR0647S		
		GGTAACTCTAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTG CGCTAGACTGGGCGCTACCGCTAACCAATCCGCTATAAGTTTCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCTGGT CACAGTGTCTTTCAGCTAGCACTAAGGGCCCTCAGTGTCCCCCTGGCCCTAGCTCTAAGTCTACTAGCGGTG GCACCGCCGTCTGGGCTCCTGTCAAGGACTACTTCCCAGAGCCGTGACCGTGTCTTGAATAGCGGCG CTCTGACTAGCGGAGTGCAACCTTCCCCCGCGTGTGCTGAGTCTAGCGGCTGTATAGCTGTCTAGCGTGT GACCGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCACTCAGACCTATATCTGTAACTGAAACCAAGCCTAGTAACACTAAG GTGGACAAGCGGGTGAACCTAAGTCTTGCATAGAAGTCTACACCTGTCCCCTGCGCTGCCCAAGAAGTCTG CTGGCGGACCTAGCGTGTCTGTCTCCACCTAAGCCTAAAGACACCTGATGATTAGTAGGACCCCCGAAGT GACCTGCGTGTGTGGAGCTCAGCCACGAGGACCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTATGTGGACGGCGTGG AAGTGCAACGCTAAGACTAAGCCTAGAGAGGAACAGTATAACTCACCTATAGGGTGGTGTAGTGTCTGA CCGTGCTGCACCGGACTGGCTGAACGGCAAAGATATAAGTGTAAAGTCTTAAACAGGCGCTGCTGCC CTATCGAAAAGACTATCTCTAAGGCTAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCAGGTCTACACCTGCCCCCTAGTAG AGAAGAGATGACTAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCTAGCGATATCGCCGTG GAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCCGAGAACACTATAAGACTACCCCTGTGTGTGATAGCGACGGCTCT TTCTTCTGTACTCTAAACTGACCGTGGACAAGTCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCACTGTAGCGTGA TGCAAGGAGCCCTGCACAATCACTACACTCAGAAGTCACTGAGCCTGAGTCCCGCAAGGGCGGCTCAGGCG GTAGCGATATCGTGTGCTGACTCAGTACCCGCTACCTGAGTCTGAGCCTGGCAGCGGGCTACACTGAGCT GTAGAGCTAGTCACTTATCGGCTCAGCTACCTGGCTGTGATCAGCAGAAGCCCGCCAGGCCCCCTAGACT GCTGATCTACGGCGCTAGTAATAGAGTACCGGCGTCCCGCTAGGTTTACGGGCTCAGGATCAGGCACCGA CTTACCTGACTATAGTAGCCTGGAACCGGAGGACTTCTGCTACCTACTGTGAGCAGTACTACGACTACCT CTCAGACCTCGGCCAGGAACTAAGGTGAGATTAAGGGCGGTGGCGGTAGCGCGGAGGCGGATCAGG TGGTGGTGGTAGTGGCGGCGAGGTAGTCAAGTCCAGCTGAAAGAGTCAAGCCCTGCTGCTCAAGCCTA CTCAGACCTGACCTGACCTGCACTTTAGCGGCTTTAGCCTGAGTAAAGAGCGCGGAGTGGGCTGGA TTAGACAGCTCCAGGCAAAGCCCTGAGTGGCTGGCTGGATCGACTGGGACGACGATAAGTCTACTCCA CTAGCCTGAAAACCTAGGCTGACAATCAGCAAGGACACTAGTAAACACAGGTGGTGTGACTATGACTAATA TGGACCCGCTGGACACCGCTACCTATTATTGCGCTAGAAAGTCACTCCCACTGGTGTTCGATAGCTGGGGTCA GGGAACCTGTGTCACAGTCACTAGC
SEQ ID NO:203	VL MOR08168 GL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDSLNRKVVYQQKPGQAPVLIYKNNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRQA GDEADYYCQSYDQKSLVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:204	ADN VL MOR08168 GL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCTGAGCGTGTGAGTGGCTCTGGGCCAGACCGCTAGAATCACCTGTAGCGGC GATAGCCTGAGAAACAAGGTCTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGGCCCCGTGTGCTGTATCTATAAG AACAAATAGGCTTAGCGGCATCCCGAGCGTTTACGCGCTCTAATAGCGGCAACACCGCTACCTCTGACTATTA GTAGGGCTCAGGCCGCGACGAGGCCGACTACTACTGTCAGTCTACGACGGCCAGAAGTCACTGGTCTTTG GCGGCGGAACCTAAGCTGACCGTCTG
SEQ ID NO:205	Light lambda MOR08168 GL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDSLNRKVVYQQKPGQAPVLIYKNNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRQA GDEADYYCQSYDQKSLVFGGGTKLTVLGPQAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCIISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNKYAASSYSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:206	ADN Light lambda MOR08168 GL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCTGAGCGTGTGAGTGGCTCTGGGCCAGACCGCTAGAATCACCTGTAGCGGC GATAGCCTGAGAAACAAGGTCTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGGCCCCGTGTGCTGTATCTATAAG AACAAATAGGCTTAGCGGCATCCCGAGCGTTTACGCGCTCTAATAGCGGCAACACCGCTACCTCTGACTATTA GTAGGGCTCAGGCCGCGACGAGGCCGACTACTACTGTCAGTCTACGACGGCCAGAAGTCACTGGTCTTTG GCGGCGGAACCTAAGCTGACCGTGTGGGACAGCCTAAGGCTGCCCGAGCGTACCTGTCTCCCCCAGCA GCGAGGAGTGTAGGCAACAAGGCCACCTGTGTGTGCTGATCAGCAGCTTCTACCCAGCGCCGTGACCG TGGCTTGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGGTGGAGACCACACCCAGCAAGCAGAGCAAC AACAAAGTACGCGCGCAGCAGCTAAGTGGCTGAGCCCGGAGCAGTGGGAAGGCCACAGGTCTACAGCTGC CAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCCTGGAAAAGACCGTGGCCCAACCGAGTGACG
SEQ ID NO:207	Pesado	

Biparatópico MOR08168/MOR0647S		
	MOR08168IgG 1LALA_6475sc Fv GL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYINWVRQAPGKLEWVSGISWGVNTHYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDFVWGGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGSGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSRASQFIGSRYLAWYQKPKGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTD FTLTISLLEPEDFATYYCQQYDYPQTFGQGT KVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLKESGPAVLKPTQTL TLCTFSGFSLSNRGGGVGWIRQPPGKALEWLAVIDWDDKSYSTSLKRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVD ATYYCARMHLPLVFDWSWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:208	ADN pesado MOR08168IgG 1LALA_6475sc FvGL	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCTGGCGGATCACTGAGACTGAGCTGTGCCG TAGTGGCTTACCTTTAGCGACTATGTGATTAAGTGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGT GTCAGGCATTAGTTGGAGCGCGGTGAACACTCACTACGCCGATAGCGTGAAAGGCCGGTTCATTAGCCG GGATAACTCTAAGAACACCTGTACTGAGATGAATAGCTGAGAGCCGAGGACACCGCTCTACTACTG CGCTAGACTGGCGCTACCGCTAACAACTCCGCTATAAGTTCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCTGGT CACAGTGTCTCAGTAGCACTAAGGGCCCTCAGTGTTCCTCCCTGGCCCTAGCTCTAAGTCTACTAGCGGTG GCACCGCCGCTCTGGGCTGCTGTGTAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAATAGCGGCG CTCTGACTAGCGGAGTGACACCTTCCCGCCGTGCTGAGTCTAGCGGCTGTATAGCCTGTCTAGCGCTGT GACCGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCACTCAGACCTATATCTGTAACGTGAACCAAGCAAGCTAGTAACACTAAG GTGGACAAGCGGGTGAACCTAAGTCTTGCATAAGACTCACCTGTCCCGCTGCCCTGCCAGAAAGCTG CTGGCGGACCTAGCGTGTCTCTGTTCCCACTAAGCTAAAGACACCTGTGATTAGTAGGACCCCGAAGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGACCTGAAGTGAAGTCAATTGGTATGTGGACGGCGTGG AAGTGCACAACGCTAAGACTAAGCCTAGAGAGGAACAGTATACTCCACTATAGGGTGGTGTCAAGTGTGA CCGTGCTGACAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGTAAAGTCTCTAACAGGCCCTGCCTGCC CTATCGAAAGACTATCTCTAAGGCTAAGGGCCAGCCTAGAGAACCAGGCTCTACACCTGTCCCGCTAGTAG AGAAGAGATGACTAAGAAATCAGGTGCTCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCACTACCTAGCGATATCGCGGTG GAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCGAGAACAACTATAAGACTACCCCGCTGTGCTGAGTACGACGGCTCT TTCTCTGTACTCTAACTGACCGTGGACAAGTCTAGGTGGCAGCAGGGCAAGCTGTTCAGTGTAGCGTGA TGACGAGGCTCTGACCAATCACTCACTCAGAACTCACTGAGCTGAGTCCCGGCAAGGGCGGCTCAGGCG GTAGCGATATCTGTGACTCAGTCAACCGCTACCTGAGTCTGAGCCCTGCGGACGGGCTACACTGAGCT GTAGAGCTAGTCACTTATCGGCTCACGCTACCTGGCTGTGATCAGCAGAACCCGCCAGGCGCCCTAGACT GCTGATCTACGGCGCTAGTAATAGAGCTACCGCGTGGCGCTAGGTTAGCGGCTCAGGATCAGGCAAGCA CTTTACCTGACTATTAGTACCTGGAACCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGAGCAGTACTACGACTACC CTCAGACCTTCGGCCAGGGAACCTAAGGTGAGATTAAGGGCGGTGGCGGTAGCGGCGGAGGCGGATCAGG TGGTGGTGGTGTGGCGGCGGAGGTAGTCAGGTCCAGCTGAAGAGTCAAGCCCTGCCCTGTGTCAGGCTA CTCAGACCTGACCTGAGCTGCACTTTAGCGGCTTTAGCCTGAGTAATAGAGCGGCGGAGTGGGCTGGA TTAGACAGCCTCAGGCAAGCCCTGGAGTGGCTGGCTGGATCGACTGGGACGACGATAAGTCTACTCCA CTAGCCTGAAAACCTAGGCTGACAATCAGCAAGGCACTAGTAAAAACAGGTGGTGTGACTATGACTAATA TGGACCCGTTGGACACCGCTACCTATTATTGCGCTAGAATGCACTCCCACTGGTGTGCTAGCTGGGCTCA GGGAACCTGGTCAAGTCACTAGC

Otros anticuerpos descritos en el presente documento, incluyen aquellos en los que los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos han sido mutados, pero tienen al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en las que no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones variables cuando se comparan con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, conservando al mismo tiempo sustancialmente la misma actividad terapéutica.

- 5 Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a LRP6, las secuencias VH, VL, cadena ligera de longitud completa y cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) se pueden "mezclar y combinar" para crear otros Anticuerpos LRP6. Dichos anticuerpos contra LRP6 "mixtos y apareados" se pueden analizar usando los ensayos de unión conocidos en la materia (por ejemplo, ELISA y otros ensayos descritos en la sección de Ejemplo). Cuando estas cadenas se mezclan y se combinan, una secuencia VH de un emparejamiento VH/VL particular debe reemplazarse con una secuencia VH estructuralmente similar. Del mismo modo, una secuencia de cadena pesada de longitud completa desde un emparejamiento de cadena ligera de longitud completa/longitud completa particular debería reemplazarse por una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Del mismo modo, una secuencia VL de un emparejamiento VH/VL particular debería reemplazarse con una secuencia VL estructuralmente

similar. Del mismo modo, una secuencia de cadena ligera de longitud completa de un apareamiento de cadena ligera de longitud completa/longitud completa particular debería reemplazarse con una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo que tiene: una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

La presente divulgación proporciona anticuerpos contra LRP6 que se unen al dominio β de propulsor 1 de LRP6 que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las VH CDR1 de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 1, 21 y 47. Las secuencias de aminoácidos de las VH CDR2 de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 2, 22 y 48. Las secuencias de aminoácidos de las VH CDR3 de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 3, 23 y 49. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR1 de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 4, 24 y 50. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR2 de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 5, 25 y 51. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR3 de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 6, 26 y 52. Las regiones CDR se delinean utilizando el sistema Kabat (Kabat y col., (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH No. 91-3242; Chothia y col., (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia y col., (1989) Nature 342: 877-883; y Al-Lazikani y col., (1997) J. Mol. Biol. 273, 927-948).

La presente descripción también proporciona anticuerpos contra LRP6 que se unen al dominio β de propulsor 3 de LRP6 que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las VH CDR1 de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 69, 93 y 115. Las secuencias de aminoácidos de las VH CDR2 de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 70, 94 y 116. Las secuencias de aminoácidos de las VH CDR3 de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 71, 95 y 117. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR1 de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 72, 96 y 118. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR2 de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 73, 97 y 119. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR3 de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 74, 98 y 120. Las regiones CDR se delinean utilizando el sistema Kabat (Kabat y col., (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH No. 91-3242; Chothia y col., (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia y col., (1989) Nature 342: 877-883; y Al-Lazikani y col., (1997) J. Mol. Biol. 273, 927-948).

Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a LRP6 y que la especificidad de unión a antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias VH CDR1, 2 y 3 y las secuencias VL CDR1, 2 y 3 se pueden "mezclar y combinar" (es decir, Las CDR de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y combinar, aunque cada anticuerpo debe contener un VH CDR1, 2 y 3 y un VL CDR1, 2 y 3 para crear otras moléculas de unión a LRP6 de la invención. Dichos anticuerpos "mezclados y apareados" de LRP6 pueden analizarse usando los ensayos de unión conocidos en la materia y los descritos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA). Cuando las secuencias VH CDR se mezclan y se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia VH particular debe reemplazarse por una secuencia (s) de CDR estructuralmente similar. Del mismo modo, cuando las secuencias VL CDR se mezclan y se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia VL particular debe reemplazarse con una secuencia (s) de CDR estructuralmente similar. Será evidente para el experto en la materia que pueden crearse nuevas secuencias VH y VL sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de VH y/o VL con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR mostradas en el presente documento para anticuerpos monoclonales de la presente invención.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal 1 de LRP6 propulsor β aislado o fragmento del mismo que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 21 y 47; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 22 y 48; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 23 y 49; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 24 y 50; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 25 y 51; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 26 y 52; en donde el anticuerpo se une a LRP6.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado de LRP6 β -propulsor 3o fragmento del mismo que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 69, 93 y 115; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 70, 94 y 116; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 71, 95 y 117; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que

consiste en las SEQ ID NO: 72, 96 y 118; una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73, 97 y 119; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74, 98 y 120; en donde el anticuerpo se une a LRP6.

El anticuerpo de la invención que se une a LRP6 comprende una región variable de la cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 1; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 4; una región variable de la cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 6.

En una realización específica, un anticuerpo que se une a LRP6 comprende un VH de SEQ ID NO: 14 y VL de SEQ ID NO: 13.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o cadenas pesadas o ligeras de longitud completa que son "el producto de" o "derivado de" una secuencia de línea germinal particular si se obtienen las regiones variables o cadenas de longitud completa del anticuerpo de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Dichos sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o el cribado de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana mostrada en el fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas humanas de la línea germinal y seleccionando la inmunoglobulina humana de la línea germinal secuencia que está más cerca en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas naturales o introducción intencional de sitio dirigido mutaciones. Sin embargo, en las regiones marco VH o VL, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican al anticuerpo humano como ser humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de la inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (*por ejemplo*, secuencias murinas de la línea germinal). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o al menos 95 %, o incluso al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano recombinante mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana en las regiones marco VH o VL. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser derivados de anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, anticuerpos de dominio, nanocuerpos y unicuerpos. Un "anticuerpo monocatenario" (scFv) consiste en una única cadena polipeptídica que comprende un dominio VL unido a un dominio V en el que el dominio VL y el dominio VH están emparejados para formar una molécula monovalente. El anticuerpo monocatenario se puede preparar según el procedimiento conocido en la materia (véase, por ejemplo, Bird y col., (1988) Science 242: 423-426 y Huston y col., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883) Un "disbud" consiste en dos cadenas, comprendiendo cada cadena una región variable de cadena pesada conectada a una región variable de cadena ligera en la misma cadena polipeptídica conectada por un conector peptídico corto, donde las dos regiones en la misma cadena no se emparejan entre sí, pero con dominios complementarios en la otra cadena para formar una molécula biespecífica. Los procedimientos para preparar diacuerpos son conocidos en la materia (Véase, por ejemplo, Holliger y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 y Poljak y col., (1994) Structure 2: 1121-1123) Los anticuerpos de dominio (dAb) son pequeñas unidades de unión funcional de anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de los anticuerpos. Los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamífero. Se conocen en la técnica más detalles de anticuerpos de dominio y procedimientos de producción de los mismos (véase, por ejemplo, Las patentes de Estados Unidos n.º 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; Patentes europeas 0368684 & 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609. Los nanocuerpos se derivan de las cadenas pesadas de un anticuerpo. Un nanocuerpo comprende típicamente un solo dominio variable y dos dominios constantes (CH2 y CH3) y retiene la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. Los nanocuerpos se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la materia (Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6,765,087, Patente de Estados Unidos n.º 6,838,254, WO 06/079372) Los anticuerpos constan de una cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo IgG4. Los anticuerpos pueden prepararse mediante la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. Se pueden encontrar más detalles de unicuerpos y procedimientos para prepararlos en WO2007/059782.

Además de los ligandos de Wnt, se espera que los anticuerpos de Propulsor 1 de LRP6 inhiban la interacción con otros ligandos de unión de Propulsor 1 (por ejemplo, Esclerostina, Dkk1). De forma similar, se espera que los

anticuerpos Propulsor 3 inhiban la interacción con otros ligandos que se unen a el propulsor 3 (por ejemplo, Dkk1). Además, se puede esperar que los anticuerpos de unión a el propulsor 1 y 3 afecten a la actividad de otros moduladores de señalización de Wnt, p. R-espondinas

5 Anticuerpos homólogos

En aún otra realización, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias descritas en la Tabla 1, y el anticuerpo se une a una proteína LRP6 (por ejemplo, humano y/o cinomolgo LRP6), y conserva las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado (o un fragmento funcional del mismo) que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 13; el anticuerpo se une a el propulsor β 1 de LRP6 (por ejemplo, humano y/o cinomolgo LRP6), e inhibe la actividad de señalización de las proteínas Wnt dependientes del propulsor 1, que pueden medirse en el ensayo del gen indicador Wnt u otra medida de señalización dirigida Wnt (por ejemplo, fosforilación de LRP6, estabilización de β -catenina y translocación nuclear, proliferación celular/supervivencia) como se describe en el presente documento. En un ejemplo específico, tales anticuerpos tienen una CE_{50} valor en un ensayo Wnt1 de menos de 10 nM cuando se usa medio acondicionado o usando células transfectadas.

Además para los anticuerpos de Propulsor 1, las secuencias de nucleótidos parentales de cadena pesada variables se muestran en SEQ ID NO: 16, 38 y 64. Las secuencias de nucleótidos parentales de cadena ligera variable se muestran en SEQ ID NO: 15, 37 y 63. Cadena pesada de longitud completa las secuencias optimizadas para la expresión en una célula de mamífero se muestran en SEQ ID NO: 20, 42 y 68. Las secuencias de cadena ligera de longitud completa optimizadas para la expresión en una célula de mamífero se muestran en SEQ ID NO: 19, 41 y 67. Otros anticuerpos de la invención incluyen aminoácidos o ácidos nucleicos que han sido mutados, pero tienen al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad con las secuencias descritas anteriormente. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en las que no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos por delección, inserción o sustitución de aminoácidos en las regiones variables en comparación con las regiones variables representadas en la secuencia descrito arriba.

Las secuencias de aminoácidos VH y/o VL pueden ser 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos VH y/o VL pueden ser idénticas, excepto una sustitución de aminoácidos en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que tienen alto (yo. *mi.*, 80 % o más) la identidad de las regiones VH y VL de aquellos anticuerpos Propulsor 1 descritos en la Tabla 1 puede obtenerse mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida o dirigida por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NO: 14, 34, 60, 13, 33 y 59, respectivamente, seguido del ensayo del anticuerpo alterado codificado para la función retenida usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "identidad porcentual" entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir., % identidad es igual al número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que debe introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

Adicionalmente o alternativamente, las secuencias de proteínas descritas en el presente documento se pueden usar además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Por ejemplo, tales búsquedas se pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2.0) de Altschul y col., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10.

Anticuerpos con modificaciones conservadoras

Un anticuerpo puede tener una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias CDR tienen secuencias de aminoácidos específicas basadas en los anticuerpos descritos en el presente documento, o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos contra LRP6 de la invención.

Anticuerpos que se unen al mismo epítipo

La presente descripción proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos contra LRP6 descritos en la Tabla 1. Por lo tanto, se pueden identificar anticuerpos adicionales en función de su capacidad de competición cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de, de una manera estadísticamente significativa) con anticuerpos de la invención en ensayos de unión de LRP6. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos de la presente invención a una proteína LRP6 (por ejemplo, humano y/o cinomolgo LRP6) demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo por la unión a LRP6; dicho anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo o relacionado (por ejemplo, un epítipo estructuralmente similar o espacialmente proximal) en la proteína LRP6 como el anticuerpo con el que compete. El anticuerpo que se une al mismo epítipo en LRP6 que los anticuerpos de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar y aislar como se describe en el presente documento.

Anticuerpos modificados y modificados genéticamente

Un anticuerpo de la invención además puede prepararse usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de VH y/o VL mostradas aquí como material de partida para modificar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas del anticuerpo de partida. Un anticuerpo se puede diseñar modificando uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (yo. *mi.*, VH y/o VL), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede modificarse genéticamente modificando residuos dentro de la (s) región (regiones) constante (s), por ejemplo para alterar la (s) función (es) efectora (s) del anticuerpo.

Un tipo de ingeniería de región variable que se puede realizar es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann y col., (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones y col., (1986) *Nature* 321: 522-525; Queen y col., (1989) *Proc. Natl. Acad., U.S.A.* 86: 10029-10033; la patente de Estados Unidos n.º 5,225,539 de Wintery las patentes de Estados Unidos n.º 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen et al.)

Por consiguiente, otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal de Propulsor 1 aislado, o fragmento del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, la secuencia de CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; la secuencia de CDR3 que tiene el aminoácido de SEQ ID NO: 3, respectivamente; y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la secuencia de CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y la secuencia de CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, respectivamente. Por lo tanto, tales anticuerpos contienen las secuencias VH y VL CDR de anticuerpos monoclonales, aunque pueden contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

Dichas secuencias marco se pueden obtener de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias germinales humanas "V BASE" (disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), como bien como en Kabat y col., (1991) *Secuencias de proteínas de interés inmunológico*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH No. 91-3242; Chothia y col., (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia y col., (1989) *Nature* 342: 877-883; y Al-Lazikani y col., (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-948; Tomlinson y col., (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 776-798; y Cox y col., (1994) *Eur. J Immunol.* 24: 827-836.

Un ejemplo de secuencias marco para su uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias estructurales utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, secuencias consenso y/o secuencias marco usadas por los anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias VH CDR1, 2 y 3, y las secuencias VL CDR1, 2 y 3, pueden injertarse en regiones estructurales que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal del que deriva la secuencia estructural, o las secuencias CDR pueden ser injertadas en regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar los residuos dentro de las regiones marco para mantener o mejorar la capacidad de unión del antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

Injerto de fragmentos de anticuerpos en marcos o armazones alternativos

Se puede emplear una amplia variedad de armazones/armazones de anticuerpos/inmunoglobulinas siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente a LRP6. Dichos armazones o armazones incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de los mismos, e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, que preferentemente tienen aspectos humanizados. Los expertos en la materia continúan descubriendo y desarrollando Nuevos marcos, armazones y fragmentos.

En algunas realizaciones, los Fab se convierten a formato silencioso IgG1 cambiando la región Fc. Por ejemplo, los anticuerpos MOR08168, MOR08545, MOR06706, MOR06475, MOR08193 y MOR08473 en la Tabla 1 se pueden convertir al formato de IgG1 añadiendo la secuencia de aminoácidos:

CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 209).

y sustituyendo la cadena ligera por: CS si la cadena ligera es lambda, o C si la cadena ligera es kappa. Como se usa en el presente documento, una "IgG1 silenciosa" es una secuencia de Fc de IgG1 en la que la secuencia de aminoácidos se ha alterado para disminuir las funciones efectoras mediadas por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC). Tal anticuerpo típicamente tendrá una unión disminuida a los receptores de Fc. En algunas otras realizaciones, los Fab se convierten a formato IgG2. Por ejemplo, los anticuerpos MOR08168, MOR08545, MOR06706, MOR06475, MOR08193 y MOR08473 en la Tabla 1 se pueden convertir a formato IgG2 sustituyendo la secuencia constante con la secuencia constante para la cadena pesada de IgG2:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP
 APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWWYVDGVEVH
 NAAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAAIEKTISK
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TTPMQLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 210).

Anticuerpos humanos o humanizados

La presente invención proporciona anticuerpos completamente humanos que se unen específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 de ser humano y/o de mono cinomolgo). En comparación con los anticuerpos quiméricos o humanizados, los anticuerpos contra LRP6 humana de la invención tienen una antigenicidad disminuida adicional cuando se administran a sujetos humanos.

Los anticuerpos humanos de LRP6 pueden generarse usando procedimientos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la tecnología humanitaria utilizada para convertir anticuerpos no humanos en anticuerpos humanos modificados genéticamente. La publicación de patente de Estados Unidos n.º 20050008625 describe un procedimiento *in vivo* para reemplazar una región variable de anticuerpo no humano con una región variable humana en un anticuerpo mientras se mantiene la misma o se proporcionan mejores características de unión en relación con la del anticuerpo no humano. El procedimiento se basa en el reemplazo guiado por epítipo de regiones variables de un anticuerpo de referencia no humano con un anticuerpo completamente humano. El anticuerpo humano resultante generalmente no está relacionado estructuralmente con el anticuerpo de referencia no humano, pero se une al mismo epítipo en el mismo antígeno que el anticuerpo de referencia. Brevemente, el enfoque de reemplazo de complementariedad guiado por epítipo en serie se habilita estableciendo una competencia en células entre un "competidor" y una biblioteca de híbridos diversos del anticuerpo de referencia ("anticuerpos de prueba") para la unión a cantidades limitantes de antígeno en presencia de un sistema indicador que responde a la unión del anticuerpo de prueba al antígeno. El competidor puede ser el anticuerpo de referencia o derivado del mismo tal como un fragmento Fv monocaténario. El competidor también puede ser un ligando natural o artificial del antígeno que se une al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. Los únicos requisitos del competidor son que se une al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, y que compete con el anticuerpo de referencia para la unión al antígeno. Los anticuerpos de prueba tienen una región V de unión a antígeno en común a partir del anticuerpo de referencia no humano, y la otra región V seleccionada al azar de una fuente diversa tal como una biblioteca de repertorio de anticuerpos humanos. La región V común del anticuerpo de referencia sirve como guía, colocando los

anticuerpos de prueba en el mismo epítipo sobre el antígeno, y en la misma orientación, de modo que la selección está sesgada hacia la mayor fidelidad de unión al antígeno al anticuerpo de referencia.

Se pueden usar muchos tipos de sistema indicador para detectar las interacciones deseadas entre los anticuerpos de prueba y el antígeno. Por ejemplo, los fragmentos informadores complementarios se pueden unir al antígeno y al anticuerpo de prueba, respectivamente, de modo que la activación del indicador por complementación de fragmentos solo se produce cuando el anticuerpo de prueba se une al antígeno. Cuando las fusiones del anticuerpo testigo y del fragmento indicador del antígeno se expresan juntamente con un competidor, la activación del indicador se vuelve dependiente de la capacidad del anticuerpo de prueba para competir con el competidor, que es proporcional a la afinidad del anticuerpo de prueba por el antígeno. Otros sistemas informadores que se pueden usar incluyen el reactivador de un sistema de reactivación de reportero inhibido automáticamente (RAIR) como se describe en La publicación de patente de Estados Unidos n.º de serie 10/208,730 (N.º de publicación 20030198971), o el sistema de activación de la competencia divulgado en La publicación de patente de Estados Unidos n.º de serie 10/076,845 (N.º de publicación 20030157579).

Con el sistema de reemplazo de complementariedad guiado por epítipo en serie, la selección se hace para identificar células que expresan un único anticuerpo de prueba junto con los componentes del competidor, antígeno e indicador. En estas células, cada anticuerpo de prueba compite uno contra uno con el competidor por la unión a una cantidad limitante de antígeno. La actividad del indicador es proporcional a la cantidad de antígeno unido al anticuerpo de prueba, que a su vez es proporcional a la afinidad del anticuerpo de prueba por el antígeno y la estabilidad del anticuerpo de prueba. Los anticuerpos de prueba se seleccionan inicialmente sobre la base de su actividad en relación con la del anticuerpo de referencia cuando se expresa como el anticuerpo de prueba. El resultado de la primera ronda de selección es un conjunto de anticuerpos "híbridos", cada uno de los cuales está compuesto por la misma región V no humana del anticuerpo de referencia y una región V humana de la biblioteca, y cada uno de los cuales se une al mismo epítipo en el antígeno que el anticuerpo de referencia. Uno o más de los anticuerpos híbridos seleccionados en la primera ronda tendrán una afinidad por el antígeno comparable o mayor que la del anticuerpo de referencia.

En la segunda etapa de reemplazo de la región V, las regiones V humanas seleccionadas en el primer paso se usan como guía para la selección de reemplazos humanos para la región V del anticuerpo de referencia no humano restante con una biblioteca diversa de regiones V humanas afines. Los anticuerpos híbridos seleccionados en la primera ronda también se pueden usar como competidores para la segunda ronda de selección. El resultado de la segunda ronda de selección es un conjunto de anticuerpos completamente humanos que difieren estructuralmente del anticuerpo de referencia, pero que compiten con el anticuerpo de referencia por la unión al mismo antígeno. Algunos de los anticuerpos humanos seleccionados se unen al mismo epítipo en el mismo antígeno que el anticuerpo de referencia. Entre estos anticuerpos humanos seleccionados, uno o más se une al mismo epítipo con una afinidad que es comparable o mayor que la del anticuerpo de referencia. Usando uno de los anticuerpos contra LRP6 de ratón o quiméricos descritos anteriormente como el anticuerpo de referencia, este procedimiento puede emplearse fácilmente para generar anticuerpos humanos que se unen a LRP6 humana con la misma especificidad de unión y la misma o mejor afinidad de unión. Además, tales anticuerpos humanos LRP6 también pueden obtenerse comercialmente de compañías que habitualmente producen anticuerpos humanos, por ejemplo, KaloBios, Inc. (Mountain View, CA).

Anticuerpos de camélido

Las proteínas de anticuerpos obtenidas de miembros de la familia del camello y el dromedario (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*), incluyendo miembros del nuevo mundo como especies de llamas (*Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*) se han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad para sujetos humanos. Ciertos anticuerpos IgG de esta familia de mamíferos que se encuentran en la naturaleza carecen de cadenas ligeras, y por lo tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria de cuatro cadenas típica que tiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, para anticuerpos de otros animales. Ver PCT/EP93/02214 (documento WO 94/04678 publicado el 3 de marzo de 1994).

Una región del anticuerpo de camélido que es el pequeño dominio variable identificado como VHH puede obtenerse mediante ingeniería genética para producir una proteína pequeña que tiene alta afinidad por un objetivo, dando como resultado una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como "nanocuerpo de camélido". Véase la patente de Estados Unidos número 5,759,808 expedida el 2 de junio de 1998; véase también Stijlemans y col., (2004) *J Biol Chem* 279: 1256-1261; Dumoulin y col., (2003) *Nature* 424: 783-788; Pleschberger y col., (2003) *Bioconjugate Chem* 14: 440-448; Cortez-Retamozo y col., (2002) *Int J Cancer* 89: 456-62; y Lauwereys y col., (1998) *EMBO J* 17: 3512-3520. Las librerías modificadas de anticuerpos camélidos y fragmentos de anticuerpos están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Ablynx, Ghent, Bélgica. Al igual que con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede alterarse de forma recombinante para obtener una secuencia que se asemeja más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo puede ser "humanizado". Por lo tanto, la baja antigenicidad natural de los anticuerpos camélidos para los seres humanos puede reducirse aún más.

El nanocuerpo de camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte del de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de solo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de los nanocuerpos de camélidos para unirse a sitios antigénicos que son funcionalmente invisibles para las proteínas de anticuerpos más grandes, es decir, los nanocuerpos de camélidos son útiles como reactivos para detectar antígenos que de otra manera son crípticos usando técnicas inmunológicas clásicas y como posibles agentes terapéuticos. Por lo tanto, otra consecuencia de tamaño pequeño es que un nanocuerpo de camélido puede inhibirse como resultado de unirse a un sitio específico en un surco o hendidura angosta de una proteína diana, y por lo tanto puede servir en una capacidad que se asemeja más a la función de un fármaco de bajo peso molecular que el de un anticuerpo clásico.

El bajo peso molecular y el tamaño compacto dan como resultado adicionalmente que los nanocuerpos de los camélidos son extremadamente termoestables, estables a pH extremo y a la digestión proteolítica, y poco antigénicos. Otra consecuencia es que los nanocuerpos de camélidos se mueven fácilmente del sistema circulatorio a los tejidos, e incluso cruzan la barrera hematoencefálica y pueden tratar trastornos que afectan el tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar aún más el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Véase la solicitud de patente de Estados Unidos 20040161738 publicada en 19 de agosto de 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad para los humanos indican un gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas pueden expresarse completamente en células procariotas tales como *E. coli* y se expresan como proteínas de fusión con bacteriófago y son funcionales.

Por consiguiente, el presente enunciado también se refiere a un anticuerpo de camélido o nanocuerpo que tiene una alta afinidad por LRP6. En ciertas realizaciones en el presente documento, el anticuerpo de camélido o nanocuerpo se produce naturalmente en el animal camélido, es decir, es producido por el camélido después de la inmunización con LRP6 o un fragmento peptídico del mismo, usando las técnicas descritas en el presente documento para otros anticuerpos. Alternativamente, el nanocuerpo de camélido LRP6 está diseñado, es decir, producido por selección, por ejemplo, de una biblioteca de fagos que presenta proteínas de nanocuerpo de camélido mutagenizadas apropiadamente usando procedimientos de cribado con LRP6 como diana como se describe en los ejemplos de esta memoria. Los nanocuerpos diseñados pueden personalizarse aún más mediante ingeniería genética para tener una semivida en un sujeto receptor de 45 minutos a dos semanas. En una realización específica, el anticuerpo de camélido o nanocuerpo se obtiene injertando las secuencias de CDR de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos humanos de la invención en secuencias de marco de anticuerpo de nanocuerpo o dominio único, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 94/04678.

Anticuerpos multivalentes

La presente divulgación también se refiere a anticuerpos multivalentes (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos biparatópicos) que comprenden al menos dos dominios de unión a receptores para dos sitios de unión diferentes en uno o más receptores de diana o receptores. Los beneficios clínicos pueden ser proporcionados por la unión de dos o más especificidades de unión dentro de un anticuerpo (Morrison y col., (1997) *Nature Biotech.* 15: 159-163; Alt y col., (1999) *FEBS Letters* 454: 90-94; Zuo y col., (2000) *Protein Engineering* 13: 361-367; Lu y col., (2004) *JBC* 279: 2856-2865; Lu y col., (2005) *JBC* 280: 19665-19672; Marvin y col., (2005) *Acta Pharmacologica Sinica* 26: 649-658; Marvin y col., (2006) *Curr Opin Drug Disco Develop* 9: 184-193; Shen y col., (2007) *J Immun Methods* 218: 65-74; Wu y col., (2007) *Nat Biotechnol.* 11: 1290-1297; Dimasi y col., (2009) *J. Mol Biol.* 393: 672-692; y Michaelson y col., (2009) *mAbs* 1: 128-141.

Los anticuerpos multivalentes (por ejemplo, un único anticuerpo contra LRP6 biparatópico o biespecífico) tienen la capacidad de inhibir tanto el propulsor 1 (por ejemplo Wnt1 y el propulsor 3 (por ejemplo, Wnt3) mediación ligada. Además, e inesperadamente, los anticuerpos multivalentes (por ejemplo, un único anticuerpo contra LRP6 biparatópico o biespecífico) no muestran una potenciación significativa de una señal de Wnt. Los anticuerpos multivalentes se unen a distintas regiones de propulsor β de LRP6. Los anticuerpos de propulsor 1 se unen al dominio del propulsor β y bloquean las Wnts dependientes del propulsor 1, tales como Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt9, Wnt10A, Wnt10B e inhiben una vía de transducción de señales Wnt 1. Los anticuerpos del propulsor 3 se unen al dominio del propulsor β y bloquean las Wnts dependientes del propulsor como Wnt3a y Wnt3 e inhiben una vía de transducción de señales de Wnt3. Los anticuerpos contra LRP6 diferencian los ligandos del propulsor 1 y el propulsor 3 en dos clases separadas y se unen a distintos epítomos del receptor LRP6 diana. La conversión de fragmentos de los anticuerpos contra LRP6 (por ejemplo, Fab) a anticuerpos IgG de longitud completa da como resultado un anticuerpo que potencia (aumenta) una señal Wnt en presencia de otra proteína, tal como un ligando Wnt1 o Wnt3.

Los anticuerpos multivalentes proporcionan ventajas sobre los anticuerpos tradicionales, por ejemplo, expandiendo el repertorio de dianas, teniendo nuevas especificidades de unión, potencia incrementada y sin potenciación de la señal. Un solo anticuerpo multivalente LRP6 se puede unir a múltiples regiones de propulsor en un solo receptor objetivo LRP6 en la misma célula e inhibir la señalización de Wnt. En una realización, el anticuerpo multivalente se une a cualquier combinación de regiones de propulsores β seleccionadas del grupo que consiste en el propulsor 1, el propulsor 2, el propulsor 3 y el propulsor 4. En una realización, el anticuerpo multivalente se une a el propulsor 1 y el propulsor 3 dominios de LRP6. Por lo tanto, un solo anticuerpo multivalente LRP6 tiene una potencia de acción

incrementada uniéndose a múltiples regiones de propulsor β e inhibiendo la señalización de Wnt mediada por cada dominio. Por ejemplo, un solo anticuerpo multivalente LRP6 inhibe tanto la señalización de Wnt mediada por el propulsor 1 como el propulsor 3 uniéndose a los dominios del propulsor 1 y del propulsor 3, respectivamente. La mayor potencia de acción puede deberse a una mayor avidéz o mejor unión del anticuerpo multivalente LRP6.

Los anticuerpos multivalentes pueden producirse uniendo un scFv a un anticuerpo IgG. Los dominios VH y VL utilizados para hacer un scFv pueden derivarse del mismo anticuerpo o de diferentes anticuerpos. El scFv comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR.

La región Fc del anticuerpo IgG y el fragmento scFv se pueden unir entre sí en muchas orientaciones diferentes. En una realización, el scFv está unido al extremo C de la región Fc. En otras realizaciones, el scFv está unido al extremo N de la región Fc. En otras realizaciones, scFv están unidos tanto al extremo N como al extremo C de la región Fc. En otra realización, el scFv se puede unir a una cadena ligera de un anticuerpo. Los anticuerpos multivalentes pueden unir múltiples sitios de unión de un receptor diana al mismo tiempo. Los dominios de unión al receptor de anticuerpos multivalentes pueden unirse al menos a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más sitios de unión. Cada dominio de unión al receptor puede ser específico para el mismo sitio de unión. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender uno o más dominios de unión al receptor que son específicos para epítopos distintos en el mismo receptor diana, por ejemplo, el dominio 1 de propulsor β o el dominio 3 de propulsor β de LRP6. Alternativamente, los anticuerpos multivalentes pueden comprender uno o más dominios de unión que son específicos para epítopos en diferentes receptores diana, por ejemplo, LRP6 y un receptor que no es LRP6 tal como los receptores Erb, cmet, IGFR1, Smoothed y Notch.

Cada dominio de unión al receptor dentro de los anticuerpos multivalentes también puede tener una afinidad diferente (es decir, una mayor o menor) por el antígeno en comparación con los anticuerpos tradicionales.

Los anticuerpos multivalentes pueden ser anticuerpos biparatópicos que comprenden al menos un dominio de unión al receptor para un primer epítipo en el receptor diana LRP6 y un segundo dominio de unión al receptor para un segundo epítipo en el mismo receptor diana LRP6.

En el presente documento también se describen anticuerpos multivalentes, tales como anticuerpos biparatópicos. Estos anticuerpos biparatópicos se unen a uno o más epítopos de LRP6. ScFv están vinculados a una región Fc, por ejemplo en la región de bisagra, usando enlazadores tales como enlazadores GlySer. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une al dominio β -propulsor 1 de LRP6 se puede unir a un scFv que se une al dominio β -propulsor 3 de LRP6 usando un (GlyGlySer)₂ enlazador alineado a la región CH3 del Fc. En una realización, se usa un anticuerpo IgG de longitud completa que se une al dominio LRP6 β - propulsor 1 para unir un fragmento scFv de un anticuerpo que se une al dominio β - propulsor 3 de LRP6.

Los anticuerpos multivalentes, tales como los anticuerpos biparatópicos se pueden construir usando cualquier combinación de secuencias de cadena pesada y ligera que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Construcciones biparatópicas

Construcción	SEQ ID NO: de la cadena pesada	SEQ ID NO: de la cadena ligera
BiPa IgG del propulsor 1/scFv del propulsor 3 unido a Fc	166, 171, 173, 175, 195, 201, y 207	170, 193, 199, y 205
BiPa alternativo IgG del propulsor 1/scFv del propulsor 3 unido a la cadena ligera	177	181
BiPa inversa IgG del propulsor 3/ scFv del propulsor 1 unido a Fc	187, y 189	185

Los anticuerpos multivalentes se pueden preparar conjugando los dominios de unión al receptor constituyentes, usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada dominio de unión al receptor del anticuerpo multivalente puede generarse por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando los dominios de unión al receptor son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N- succinimidil-3- (2-

piridilditio) propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil-4- (N-maleimidometil) ciclohaxano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky y col., (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu y col., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 82:8648) Otros procedimientos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Guante. No. 78: 118-132; Brennan y col., (1985) Science 229: 81-83), y Glennie y col., (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375) Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando los dominios de unión al receptor son anticuerpos, pueden conjugarse mediante unión por sulfhidrilo de las regiones de bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En una realización particular, la región de bisagra se modifica para que contenga un número impar de residuos de sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, los dominios de unión al receptor pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este procedimiento es particularmente útil cuando el anticuerpo multivalente es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x proteína de fusión Fab. Los procedimientos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en La patente de Estados Unidos número 5,260,203; la patente de Estados Unidos número 5,455,030; la patente de Estados Unidos número 4,881,175; la patente de Estados Unidos número 5,132,405; la patente de Estados Unidos número 5,091,513; la patente de Estados Unidos número 5,476,786; la patente de Estados Unidos número 5,013,653; la patente de Estados Unidos número 5,258,498; y la patente de Estados Unidos número 5,482,858.

La unión de los anticuerpos multivalentes a sus dianas puede confirmarse mediante, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de particular interés mediante el empleo de un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos multivalentes que comprenden al menos dos dominios de unión a receptor diferentes de los anticuerpos de la invención que se unen a LRP6. Los dominios de unión al receptor pueden unirse entre sí mediante fusión de proteínas o unión covalente o no covalente. Los anticuerpos tetravalentes se pueden obtener, por ejemplo, entrecruzando los anticuerpos de la invención con un anticuerpo que se une a las regiones constantes de los anticuerpos de la invención, por ejemplo, la región Fc o bisagra.

Orientación de anticuerpos multivalentes

La invención se refiere a anticuerpos multivalentes que tienen múltiples dominios de unión a receptor ("RBD"), que incluyen, por ejemplo, regiones variables de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab), scFv, diacuerpos de cadena sencilla o anticuerpos IgG. Los ejemplos de RBD son componentes de un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; a F(ab)₂ fragmento, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward y col., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Los RBD también son componentes de anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, micucuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, (2005) Nature Biotechnology 23: 1126-1136).

Los anticuerpos multivalentes de la invención se generan en cualquier orientación usando al menos un dominio de unión al receptor (por ejemplo, un scFv, un diacuerpo monocatenario, una región variable de anticuerpo) siempre que los anticuerpos multivalentes resultantes retengan actividad funcional (por ejemplo, Inhibición de la señalización Wnt) Debe entenderse que puede añadirse cualquier número de dominios de unión al receptor al extremo C y/o al extremo N del Fc siempre que los anticuerpos multivalentes resultantes retengan actividad funcional (por ejemplo, inhibición de la señalización de Wnt). En una realización, uno, dos, tres o más dominios de unión a receptor están unidos al extremo C de la región Fc. En otras realizaciones, uno, dos, tres o más dominios de unión a receptor están unidos al extremo N de la región Fc. En otras realizaciones, uno, dos, tres o más dominios de unión a receptor están unidos tanto al extremo N como al extremo C de la región Fc. Por ejemplo, los anticuerpos multivalentes de la invención pueden comprender más de un dominio de unión al receptor del mismo tipo unido al extremo C y/o al extremo N de una región Fc, por ejemplo, scFv-scFv-Fc-IgG. Alternativamente, los anticuerpos multivalentes de la invención pueden comprender más de un dominio de unión al receptor de un tipo diferente unido al extremo C y/o al extremo N de la región Fc, por ejemplo, scFv-diacuerpo-Fc-IgG. En otra realización, uno, dos, tres o más dominios de unión a receptor (por ejemplo, scFv) están unidos al extremo C de una IgG. En otra realización, uno, dos, tres o más dominios de unión a receptor (por ejemplo, scFv) están unidos al extremo N de una IgG. En otra realización, uno, dos, tres o más dominios de unión a receptor (por ejemplo, scFv) están unidos al extremo N y al extremo C de una IgG.

En otras realizaciones, los anticuerpos multivalentes de la invención se generan usando más de un dominio de unión al receptor de un tipo diferente unido al extremo C, por ejemplo, scFv-diacuerpo-Fc-IgG; diacuerpo-scFv-Fc-IgG;

scFv-scFv-diacuerpo-Fc-IgG; scFv-diacuerpo-scFv-Fc-IgG; diacuerpo - scFv - scFv - Fc - IgG; región variable de anticuerpo-scFv-diacuerpo-Fc-IgG; y similares. Se pueden generar anticuerpos multivalentes con cualquier número de permutaciones de dominios de unión a receptor. Estos anticuerpos multivalentes se pueden analizar en busca de funcionalidad utilizando los procedimientos y ensayos descritos en el presente documento.

En otras realizaciones, los anticuerpos multivalentes de la invención se generan usando más de un dominio de unión al receptor de un tipo diferente unido al extremo N, por ejemplo, IgG-Fc-scFv-diacuerpo; IgG-Fc-diacuerpo-scFv; IgG-Fc-scFv-scFv-diacuerpo; IgG-Fc-scFv-diacuerpo-scFv; IgG-Fc-diacuerpo-scFv-scFv; Región variable del anticuerpo IgG-Fc-scFv-diacuerpo; y similares.

En otras realizaciones más, los anticuerpos multivalentes de la invención se generan usando un solo dominio de unión al receptor (por ejemplo, un scFv, un diacuerpo monocatenario, una región variable del anticuerpo) unido al C-terminal y N-terminal de la región Fc. En otra realización, los dominios de unión a múltiples receptores están unidos al extremo N-terminal de la región Fc, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más dominios de unión al receptor unidos a la C- término y N-terminal de la región Fc. Por ejemplo, los anticuerpos multivalentes de la invención pueden comprender uno o más scFv unidos al extremo C y al extremo N de la región Fc, por ejemplo, scFv-Fc-scFv-scFv; -scFv-scFv-Fc-scFv-scFv, y similares. En otras realizaciones, los anticuerpos multivalentes de la invención se generan usando más de un dominio de unión a receptor de un tipo diferente unido al extremo N, por ejemplo, scFv-Fc-scFv-diacuerpo; scFv-Fc-diacuerpo-scFv; scFv-Fc-scFv-scFv-diacuerpo; scFv-Fc- scFv-diacuerpo-scFv; scFv-Fc-diacuerpo-scFv-scFv; scFv-anticuerpo-región variable-scFv-diacuerpo; y similares. Se pueden generar anticuerpos multivalentes con cualquier número de permutaciones de dominios de unión a receptor. Estos anticuerpos multivalentes se pueden analizar en busca de funcionalidad utilizando los procedimientos y ensayos descritos en el presente documento.

Longitud del enlazador

Se sabe que la longitud del enlazador puede afectar en gran medida a la forma en que las regiones variables de un scFv se pliegan e interaccionan. De hecho, si se emplea un engarce corto (por ejemplo, entre 5-10 aminoácidos, entre 5-20 aminoácidos) se evita el plegamiento intracatenario y se requiere el plegamiento intercatenario para juntar las dos regiones variables para formar un sitio de unión al epítipo funcional. Para ver ejemplos de orientación y tamaño del enlazador, véase, por ejemplo, Hollinger y col., 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-6448, las solicitudes de publicación de patente de Estados Unidos n.º 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 y PCT WO2006/020258 y WO2007/024715.

También se entiende que los dominios de unión al receptor pueden estar separados por regiones enlazadoras de diversas longitudes. Los dominios de unión al receptor se pueden separar uno del otro, un C kappa/lambda, CH1, Bisagra, CH2, CH3, o la región Fc completa mediante una secuencia enlazadora. Dicha secuencia de unión puede comprender una variedad aleatoria de aminoácidos, o un conjunto restringido de aminoácidos. Tal secuencia enlazadora puede ser flexible o rígida.

Los anticuerpos multivalentes de la invención comprenden una secuencia enlazadora de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19., 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 o más residuos de aminoácidos entre uno o más de sus dominios de unión a receptor, dominios C kappa/lambda, dominios CH1, región de bisagra, dominios CH2, dominios CH3 o regiones Fc. La secuencia enlazadora puede estar compuesta por cualquier aminoácido de origen natural. En algunas realizaciones, los aminoácidos glicina y serina comprenden los aminoácidos dentro de la secuencia del engarce. En otra realización, la orientación de la región del enlazador comprende conjuntos de repeticiones de glicina (Gly)₄Ser)_n, donde n es un entero positivo igual o mayor que 1.

En una realización, los enlazadores incluyen, pero sin limitaciones, (Gly₄ Ser)₄ o (Gly₄ Ser)₃. En otra realización, los ligandos Glu y Lys residuos se pueden intercalar dentro de los enlazadores Gly-Ser para una mejor solubilidad. En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly₂Ser), (GlySer) o (Gly₃Ser). En otra realización, los enlazadores incluyen combinaciones y múltiplos de (Gly₃Ser) + (Gly₄Ser) + (GlySer). En otra realización, Ser puede reemplazarse con Ala, por ejemplo, (Gly₄Ala) o (Gly₃Ala). En otra realización más, el enlazador comprende el motivo (GluAlaAlaAlaLys)_n, donde n es un entero positivo igual o mayor que 1.

Región bisagra

Los anticuerpos multivalentes de la invención pueden comprender la totalidad o al menos una parte de una región de bisagra de anticuerpo. La región de bisagra o parte de la misma se puede conectar directamente a un dominio de unión al receptor, un CH1, un Ckappa/lambda, un CH2 o un CH3. En una realización, la región de bisagra, o una parte de la misma, puede estar conectada a través de una región enlazadora de longitud variable a un dominio de unión al receptor, un CH1, un Ckappa/lambda, un CH2 o un CH3.

Los anticuerpos multivalentes de la invención pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más regiones bisagra o partes de las mismas. Las regiones de bisagra o partes de las mismas pueden ser idénticas o ser diferentes. En una realización, los anticuerpos multivalentes de la invención comprenden una región Bisagra o una parte de la misma

de una molécula de IgG1 humana. En realizaciones adicionales, la región de bisagra o parte de la misma puede manipularse por ingeniería genética para eliminar un residuo de cisteína de origen natural, introducir un residuo de cisteína no natural o sustituir un residuo de cisteína no natural por un residuo de origen natural. En algunas realizaciones, los anticuerpos multivalentes de la invención contienen al menos una región de bisagra o parte de la misma que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos que comprende: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 211) o EPKSC (SEQ ID NO: 212). En algunas realizaciones, al menos una región de bisagra o parte de la misma se modifica por ingeniería genética para sustituir al menos un residuo de cisteína de origen natural con otro resto de aminoácido. En algunas realizaciones, al menos un residuo de cisteína de origen natural está sustituido con serina.

Los residuos de cisteína no naturales útiles para la conjugación específica de sitio se pueden diseñar en los anticuerpos multivalentes de la invención. Tales enfoques, composiciones y procedimientos se ejemplifican en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/022,073 presentada el 18 de enero de 2008, titulada "Anticuerpos modificados con cisteína para la conjugación específica del sitio" y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20070092940, presentada el 22 de septiembre de 2005.

Procedimientos de evaluación de la estabilidad de la proteína

Para evaluar la estabilidad de los anticuerpos multivalentes, se predice la estabilidad del dominio menos estable de una proteína multidominio utilizando los procedimientos descritos a continuación.

Dichos procedimientos permiten la determinación de múltiples transiciones de desplegamiento térmico donde el dominio menos estable se despliega primero o limita el umbral de estabilidad global de una unidad multidominio que se desarrolla cooperativamente (es decir, una proteína multidominio que exhibe una única transición de despliegue). El dominio menos estable se puede identificar de varias maneras adicionales. La mutagénesis se puede realizar para determinar qué dominio limita la estabilidad general. Además, la resistencia a proteasas de una proteína multidominio puede realizarse en condiciones en las que se sabe que el dominio menos estable se despliega intrínsecamente mediante DSC u otros procedimientos espectroscópicos (Fontana, y col., (1997) Fold. Des., 2: R17-26; Dimasi y col., (2009) J. Mol. Biol. 393: 672-692) Una vez que se identifica el dominio menos estable, la secuencia que codifica este dominio (o una parte de la misma) se puede emplear como una secuencia de prueba

a) Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de las composiciones de la invención se puede analizar usando varias técnicas biofísicas o bioquímicas no limitativas conocidas en la técnica. En ciertas realizaciones, la estabilidad térmica se evalúa mediante espectroscopia analítica.

Un ejemplo de procedimiento de espectroscopia analítica es Calorimetría de barrido diferencial (DSC). DSC emplea un calorímetro que es sensible a las absorbancias de calor que acompañan al despliegue de la mayoría de las proteínas o dominios de proteínas (véase, por ejemplo, Sánchez-Ruiz, y col., Biochemistry, 27: 1648-52, 1988) Para determinar la estabilidad térmica de una proteína, se inserta una muestra de la proteína en el calorímetro y la temperatura se eleva hasta que se desarrolla Fab o scFv. La temperatura a la que se desarrolla la proteína es indicativa de la estabilidad global de la proteína.

Otro ejemplo de procedimiento de espectroscopia analítica es la espectroscopia de dicroísmo circular (CD). La espectrometría de CD mide la actividad óptica de una composición en función del aumento de la temperatura. La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) mide las diferencias en la absorción de la luz polarizada de la mano izquierda frente a la luz polarizada de la mano derecha que surgen debido a la asimetría estructural. Una estructura desordenada o desdoblada da como resultado un espectro CD muy diferente del de una estructura ordenada o plegada. El espectro CD refleja la sensibilidad de las proteínas a los efectos desnaturalizantes del aumento de la temperatura y, por lo tanto, es indicativo de la estabilidad térmica de una proteína (véase van Mierlo y Steemsma, J. Biotechnol., 79 (3): 281-98, 2000).

Otro ejemplo de procedimiento de espectroscopia analítica para medir la estabilidad térmica es la Espectroscopia de Emisión de Fluorescencia (véase van Mierlo y Steemsma, citado anteriormente). Todavía otro ejemplo de procedimiento de espectroscopia analítica para medir la estabilidad térmica es la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (véase, por ejemplo, van Mierlo y Steemsma, citado anteriormente).

La estabilidad térmica de una composición de la invención se puede medir bioquímicamente. Un procedimiento bioquímico de ejemplo para evaluar la estabilidad térmica es un ensayo de provocación térmica. En un "ensayo de provocación térmica", una composición de la invención se somete a un intervalo de temperaturas elevadas durante un período de tiempo determinado. Por ejemplo, en una realización, las moléculas o moléculas scFv de prueba que comprenden moléculas scFv están sometidas a un intervalo de temperaturas crecientes, por ejemplo, durante 1-1,5 horas. La actividad de la proteína se analiza mediante un ensayo bioquímico relevante. Por ejemplo, si la proteína es una proteína de unión (por ejemplo, un polipéptido que contiene scFv o scFv de la invención), la actividad de unión de la proteína de unión se puede determinar mediante un ELISA funcional o cuantitativo.

Tal ensayo puede realizarse en un formato de alto rendimiento y los descritos en los Exámenes utilizando E. coli y cribado de alto rendimiento. Se puede crear una biblioteca de variantes scFv usando procedimientos conocidos en la técnica. La expresión de scFv puede inducirse y scFv puede someterse a exposición térmica. Las muestras de prueba desafiadas se pueden ensayar para la unión y aquellas scFv que son estables se pueden ampliar y caracterizar adicionalmente.

La estabilidad térmica se evalúa midiendo la temperatura de fusión (T_m) de una composición de la invención usando cualquiera de las técnicas anteriores (por ejemplo, técnicas de espectroscopía analítica). La temperatura de fusión es la temperatura en el punto medio de una curva de transición térmica en la que el 50 % de las moléculas de una composición están en un estado plegado (véase, por ejemplo, Dimasi y col., (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692) En una realización, los valores de T_m para un arco de scFv son aproximadamente 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, 75 °C, 76 °C, 77 °C, 78 °C, 79 °C, 80 °C, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C. En una realización, los valores de T_m para una IgG son aproximadamente 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, 75 °C, 76 °C, 77 °C, 78 °C, 79 °C, 80 °C, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C. En una realización, los valores de T_m para un anticuerpo multivalente son aproximadamente 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, 75 °C, 76 °C, 77 °C, 78 °C, 79 °C, 80 °C, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C.

La estabilidad térmica también se evalúa midiendo la capacidad específica de calor o calor (C_p) de una composición de la invención usando una técnica calorimétrica analítica (por ejemplo, DSC). El calor específico de una composición es la energía (por ejemplo, en kcal/mol) requerida para elevar en 1 °C, la temperatura de 1 mol de agua. Como C_p grande es un sello distintivo de una composición proteica desnaturalizada o inactiva. El cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) de una composición se mide determinando el calor específico de una composición antes y después de su transición térmica. La estabilidad térmica también puede evaluarse midiendo o determinando otros parámetros de estabilidad termodinámica, incluida la energía libre de despliegue de Gibbs (ΔG), la entalpía de desplegamiento (ΔH) o la entropía de despliegue (ΔS).

Uno o más de los ensayos bioquímicos anteriores (por ejemplo, un ensayo de exposición térmica) se usan para determinar la temperatura (es decir, el T_{50} valor) a la cual el 50 % de la composición conserva su actividad (por ejemplo, actividad de unión).

Además, las mutaciones en el scFv alteran la estabilidad térmica del scFv en comparación con el scFv no mutado. Cuando el scFv mutado se incorpora en un anticuerpo multivalente, el scFv mutado confiere estabilidad térmica al anticuerpo multivalente global. En una realización, el scFv comprende una sola mutación que confiere estabilidad térmica al scFv. En otra realización, el scFv comprende múltiples mutaciones que confieren estabilidad térmica al scFv. En una realización, las múltiples mutaciones en el scFv tienen un efecto aditivo sobre la estabilidad térmica del scFv.

b) % de agregación

La estabilidad de una composición de la invención se puede determinar midiendo su propensión a agregarse. La agregación puede medirse mediante una serie de técnicas bioquímicas o biofísicas no limitantes. Por ejemplo, la agregación de una composición de la invención puede evaluarse usando cromatografía, p. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). SEC separa las moléculas en función del tamaño. Una columna se llena con perlas semisólidas de un gel polimérico que admitirá iones y pequeñas moléculas en su interior, pero no grandes. Cuando se aplica una composición de proteína a la parte superior de la columna, las proteínas plegadas compactas (es decir, las proteínas no agregadas) se distribuyen a través de un mayor volumen de disolvente que el disponible para los grandes agregados de proteínas. En consecuencia, los grandes agregados se mueven más rápidamente a través de la columna, y de esta manera la mezcla se puede separar o fraccionar en sus componentes. Cada fracción se puede cuantificar por separado (por ejemplo, mediante dispersión de luz) a medida que eluye del gel. Por consiguiente, el % de agregación de una composición de la invención se puede determinar comparando la concentración de una fracción con la concentración total de proteína aplicada al gel. Las composiciones estables eluyen de la columna como esencialmente una única fracción y aparecen esencialmente como un único pico en el perfil de elución o cromatograma.

c) Afinidad de unión

La estabilidad de una composición de la invención puede evaluarse determinando su afinidad de unión a la diana. En la técnica se conocen una amplia variedad de procedimientos para determinar la afinidad de unión. Un procedimiento de ejemplo para determinar la afinidad de unión emplea resonancia de plasmón superficial. La

resonancia de plasmón superficial es un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para más descripciones, véase Jonsson, U., y col., (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U., i (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B., y col. (1995) J. Mol. Rec. 8: 125-131; y Johnsson, B., y col., (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277.

Anticuerpos con semivida extendida

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la proteína LRP6 que tienen una semivida extendida *in vivo*. Muchos factores pueden afectar a la semivida de una proteína *in vivo*. Por ejemplo, filtración de riñón, metabolismo en el hígado, degradación por enzimas proteolíticas (proteasas) y respuestas inmunogénicas (por ejemplo, neutralización de proteínas por anticuerpos y captación por macrófagos y células dendríticas). Se puede usar una variedad de estrategias para extender la semivida de los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, mediante un enlace químico con polietilenglicol (PEG), reCODE PEG, armazón de anticuerpo, ácido polisialílico (PSA), hidroxietil almidón (HES), ligandos de unión a albúmina y escudos de hidratos de carbono; por fusión genética a proteínas que se unen a proteínas séricas, tales como albúmina, IgG, FcRn y transferencia; mediante el acoplamiento (genética o químicamente) a otros restos de unión que se unen a proteínas séricas, tales como nanocuerpos, Fab, DARPin, avimers, affibodies y anticalins; por fusión genética a rPEG, albúmina, dominio de albúmina, proteínas de unión a albúmina y Fc; o por incorporación en nanoportadores, formulaciones de liberación lenta o dispositivos médicos.

Para prolongar la circulación sérica de anticuerpos *in vivo*, moléculas de polímero inertes tales como PEG de alto peso molecular pueden unirse a los anticuerpos o a un fragmento de los mismos con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica del sitio del PEG al extremo N o C de los anticuerpos o a través de épsilon-amino grupos presentes en residuos de lisina. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación puede llevarse a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Se usará una derivación de polímero lineal o ramificado que da como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se puede controlar estrechamente mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación adecuada de las moléculas de PEG con los anticuerpos. El PEG sin reaccionar puede separarse de los conjugados anticuerpo-PEG por exclusión de tamaño o por cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivatizados con PEG se pueden analizar para determinar la actividad de unión así como para *in vivo* eficacia utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos descritos en el presente documento. Los procedimientos para pegar proteínas son conocidos en la materia y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, EP 0 154 316 de Nishimura y col., y EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Otras tecnologías de pegilación modificadas incluyen la reconstitución de tecnología de ingeniería dirigida químicamente ortogonal (ReCODE PEG), que incorpora cadenas laterales químicamente especificadas en proteínas biosintéticas a través de un sistema reconstituido que incluye ARNt sintetasa y ARNt. Esta tecnología permite la incorporación de más de 30 nuevos aminoácidos en proteínas biosintéticas en *E. coli*, levadura y células de mamíferos. El ARNt incorpora un aminoácido no nativo en cualquier lugar en el que se encuentre el codón ámbar, convirtiendo el ámbar de un codón de parada en uno que indique la incorporación del aminoácido químicamente especificado.

La tecnología de pegilación recombinante (rPEG) también se puede usar para la extensión de la semivida en suero. Esta tecnología implica fusionar genéticamente una cola de proteína no estructurada de 300-600 aminoácidos con una proteína farmacéutica existente. Debido a que el peso molecular aparente de dicha cadena de proteína no estructurada es aproximadamente 15 veces mayor que su peso molecular real, la semivida en suero de la proteína aumenta mucho. A diferencia de la pegilación tradicional, que requiere conjugación química y repurificación, el proceso de fabricación se simplifica enormemente y el producto es homogéneo.

La polisialización es otra tecnología que utiliza el ácido polisialílico polimérico natural (PSA) para prolongar la vida activa y mejorar la estabilidad de péptidos y proteínas terapéuticas. El PSA es un polímero de ácido siálico (un azúcar). Cuando se usa para la administración de fármacos y péptidos terapéuticos, el ácido polisialílico proporciona un microambiente protector en la conjugación. Esto aumenta la vida activa de la proteína terapéutica en la circulación y evita que sea reconocida por el sistema inmune. El polímero PSA se encuentra naturalmente en el cuerpo humano. Fue adoptado por ciertas bacterias que evolucionaron durante millones de años para cubrir sus paredes con él. Estas bacterias polisialiladas naturalmente fueron capaces, en virtud del mimetismo molecular, de frustrar el sistema de defensa del cuerpo. El PSA, la tecnología invisible más avanzada de la naturaleza se puede

producir fácilmente a partir de tales bacterias en grandes cantidades y con características físicas predeterminadas. El PSA bacteriano es completamente no inmunogénico, incluso cuando está acoplado a proteínas, ya que es químicamente idéntico al PSA en el cuerpo humano. Otra tecnología incluye el uso de derivados de hidroxietil almidón ("HES") ligados a anticuerpos. HES es un polímero natural modificado derivado del almidón de maíz ceroso y puede ser metabolizado por las enzimas del cuerpo. Las soluciones HES generalmente se administran para sustituir el volumen de sangre deficiente y para mejorar las propiedades reológicas de la sangre. La hesilación de un anticuerpo permite la prolongación de la semivida de la circulación al aumentar la estabilidad de la molécula, así como al reducir el aclaramiento renal, lo que da como resultado un aumento de la actividad biológica. Variando diferentes parámetros, como el peso molecular de HES, se puede personalizar una amplia gama de conjugados de anticuerpos HES.

Anticuerpos que tienen una semivida aumentada *in vivo* también se puede generar introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o delecciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn del mismo (preferentemente un fragmento de dominio Fc de Fc o bisagra). Véase, por ejemplo, publicación internacional n.º WO 98/23289; publicación internacional n.º WO 97/34631; y la patente de Estados Unidos n.º 6,277,375.

Además, los anticuerpos se pueden conjugar a la albúmina para hacer que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo sea más estable *in vivo* o tener una semivida más larga *in vivo*. Las técnicas son bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y la patente europea No. EP 413,622.

El anticuerpo contra LRP6 o un fragmento del mismo también se puede fusionar a uno o más polipéptidos de albúmina sérica humana (HSA), o una parte de los mismos. HSA, una proteína de 585 aminoácidos en su forma madura es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también funciona como un transportador de ligandos endógenos y exógenos. El papel de la albúmina como molécula transportadora y su naturaleza inerte son propiedades deseables para su uso como transportador y transportador de polipéptidos *in vivo*. El uso de albúmina como componente de una proteína de fusión de albúmina como portador de diversas proteínas ha sido sugerido en los documentos WO 93/15199, WO 93/15200 y EP 413 622. También se ha propuesto el uso de fragmentos N-terminales de HSA para fusiones a polipéptidos (documento EP399666) Por consiguiente, fusionando genéticamente o químicamente o conjugando los anticuerpos o fragmentos de los mismos a la albúmina, puede estabilizar o extender la vida útil, y/o retener la actividad de la molécula durante períodos de tiempo prolongados en solución, *in vitro* y/o *in vivo*.

La fusión de la albúmina a otra proteína se puede lograr mediante manipulación genética, de modo que el ADN que codifica HSA, o un fragmento del mismo, se une al ADN que codifica la proteína. A continuación, un huésped adecuado se transforma o transfecta con las secuencias de nucleótidos fusionadas, dispuestas de este modo en un plásmido adecuado para expresar un polipéptido de fusión. La expresión puede efectuarse *in vitro* a partir de, por ejemplo, células procariotas o eucariotas, o *in vivo*, p. de un organismo transgénico. Se pueden encontrar procedimientos adicionales relacionados con las fusiones de HSA, por ejemplo, en los documentos WO 2001077137 y WO 200306007.

En una realización específica, la expresión de la proteína de fusión se realiza en líneas celulares de mamíferos, por ejemplo, líneas celulares CHO.

Conjugados de anticuerpos

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a una proteína LRP6 fusionada de manera recombinante o conjugada químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a una proteína o polipéptido heterólogo (o fragmento del mismo, preferentemente a un polipéptido de al menos 10; al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento, (por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F (ab) 2, un dominio VH, un VH CDR, un dominio VL o un VL CDR) y una proteína, polipéptido o péptido heterólogo. Los procedimientos para fusionar o conjugar proteínas, polipéptidos o péptidos con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851 y 5,112,946; las patentes europeas n.º EP 307,434 y EP 367,166; las publicaciones internacionales n.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi y col., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng y col., (1995) J. Immunol. 154: 5590-5600; y Vil y col., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11337-11341.

Se pueden generar proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de transposición de genes, barajado de motivos, mezcla de exones y/o barajado de codones (denominados colectivamente "barajado de ADN"). La transposición de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades más altas y velocidades de disociación más bajas). Véase, en general, las patentes de Estados Unidos n.º 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721,

5,834,252y 5,837,458; Patten y col., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8: 724-33; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16 (2): 76-82; Hansson y col., (1999) J. Mol. Biol. 287: 265-76; y Lorenzo y Blasco, (1998) Biotechniques 24 (2): 308- 313.

5 Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, se pueden alterar sometiendo a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a error, inserción aleatoria de nucleótidos u otros procedimientos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína LRP6 puede recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una o más moléculas heterólogas.

10 Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden fusionar a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadores es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales son comercialmente disponible. Como se describe en
15 Gentz y col., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86: 821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero sin limitaciones, la etiqueta de hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson y col., (1984) Cell 37:767) y la etiqueta "bandera".

20 En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos conjugados con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos anticuerpos pueden ser útiles para controlar o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de prueba clínica, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Tal diagnóstico y detección pueden realizarse acoplando el anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitaciones, diversas enzimas, tales como,
25 pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, entre otros, estreptavidinilbiotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no limitados a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos,
30 tales como, pero sin limitarse a, yodo (¹³¹YO, ¹²⁵YO, ¹²³YO y ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵En, ¹¹³En, ¹¹²Y en ¹¹¹En), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Ti), galio (⁶⁸Georgia, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Di-s, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²PAG, ¹⁵³Di-s, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Minnesota, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, y ¹¹⁷Estaño; y metales que emiten positrones usando varias tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos.

35 La presente invención abarca además usos de anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un resto terapéutico. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las
40 células.

Además, un anticuerpo o fragmento del mismo se puede conjugar con un resto terapéutico o resto de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Los restos terapéuticos o fracciones de fármaco no deben interpretarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína,
45 péptido o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, alfa- interferón, β-interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, un agente anti - angiogénico; o, un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina. En una realización, el anticuerpo anti-LRP6, o un fragmento del mismo, se conjuga con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan aquí "inmunokonjugados". Los inmunokonjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, mata) células. Los ejemplos incluyen taxón, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina,
55 t. colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantranodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agentes de ablación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa cloraxnbucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU)), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, antraciclina (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antracina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). (Véase, por ejemplo, Seattle Genetics US2009030472 1).

65 Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y sus derivados. Un ejemplo de un conjugado de

anticuerpo de caliqueamicina está disponible comercialmente (MylotargTM; Wyeth-Ayerst).

Las citoxinas se pueden conjugar a los anticuerpos de la invención usando la tecnología de enlazador disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Puede elegirse un enlazador que es, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para una discusión más detallada sobre los tipos de citotoxinas, los enlazadores y los procedimientos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito y col., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail y col., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne, (2003) Cancer Cell 3: 207-212; Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 750-763; Pastan y Kipitman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3: 1089-1091; Senter y Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero sin limitaciones, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. El procedimiento para preparar radioinmunoconjugados se establece en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles en el mercado, incluidos ZevalinTM (DEC Pharmaceuticals) y BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar procedimientos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención. En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético (DOTA) que se puede unir al anticuerpo a través de una molécula enlazadora. Dichas moléculas enlazadoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo y col., (1998) Clin Cancer Res. 4 (10): 2483-90; Peterson y col., (1999) Bioconjug. Chem. 10 (4): 553-7; y Zimmerman y col., (1999) Nucl. Med. Biol. 26 (8): 943-50. Las técnicas para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y col., (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies for Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª edición), Robinson y col., (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y col., (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin y col., (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985)., y Thorpe y col., (1982) Immunol. Rev. 62: 119-58.

Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, poli (cloruro de vinilo) o polipropileno.

Procedimientos de producción de anticuerpos de la invención

(i) Ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos

La invención proporciona moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de las cadenas del anticuerpo contra LRP6 descritas anteriormente. Algunos de los ácidos nucleicos de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo frente al propulsor 1 mostrada en la SEQ ID NO: 14, y/o la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 13. En una realización específica, las moléculas de ácido nucleico son las relacionadas con MOR08168 identificadas en la Tabla 1.

Algunas otras moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos 65, 80 %, 95 % o 99 %) a las secuencias de nucleótidos para MOR08168 identificadas en la Tabla 1. Cuando se expresan a partir de vectores de expresión apropiados, los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos son capaces de exhibir capacidad de unión al antígeno LRP6.

También se proporcionan en la invención polinucleótidos que codifican al menos una región CDR y habitualmente las tres regiones CDR de la cadena pesada o ligera del anticuerpo contra LRP6 expuestas anteriormente. Algunos otros polinucleótidos codifican la totalidad o sustancialmente toda la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo contra LRP6 expuesto anteriormente. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codificará cada una de las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas.

Las moléculas de ácido nucleico pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de ácidos nucleicos comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de la región variable de la cadena pesada madura que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 90 % o 99 %) a la secuencia de la región variable de la cadena pesada madura de un anticuerpo Propulsor 1 expuesto en

la SEQ ID NO: 14

Algunas otras secuencias de ácidos nucleicos que comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de la región variable de la cadena ligera madura que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos 80 %, 90 % o 99 %) a la secuencia de la región variable de la cadena ligera madura de un anticuerpo Propulsor 1 expuesto en SEQ ID NO: 13

Las secuencias de polinucleótidos pueden producirse mediante síntesis de ADN en fase sólida de novo o mediante mutagénesis por PCR de una secuencia existente (por ejemplo, secuencias como se describe en los Ejemplos a continuación) que codifican un anticuerpo contra LRP6 o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos se puede llevar a cabo mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como el procedimiento de fosfotriéster de Narang y col., (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; el procedimiento fosfodiéster de Brown y col., (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109; el procedimiento de dietilfosforamidita de Beaucage y col., (1981) *Tetra. Lett.*, 22:1859; y el procedimiento de soporte sólido de La patente de Estados Unidos n.º 4,458,066. La introducción de mutaciones en una secuencia de polinucleótidos por PCR se puede realizar como se describe en, por ejemplo, Tecnología de PCR: principios y aplicaciones para la amplificación de ADN, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; Protocolos de PCR: una guía de procedimientos y aplicaciones, Innis y col., (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila y col., (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:967; y Eckert y col., (1991) *PCR Methods and Applications* 1:17.

También se proporcionan vectores de expresión y células huésped para producir los anticuerpos contra LRP6 descritos anteriormente. Se pueden emplear diversos vectores de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas del anticuerpo contra LRP6 o fragmentos de unión. Se pueden usar vectores de expresión tanto virales como no virales para producir los anticuerpos en una célula huésped de mamífero. Los vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, por ejemplo, Harrington y col., (1997) *Nat Genet* 15:345) por ejemplo, vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos LRP6 en mamíferos (por ejemplo, células humanas) incluyen pThioHis A, B y C, pc ADN 3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV, y numerosos otros vectores conocidos en la materia para expresar otras proteínas. Los vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus HBP Epstein Barr, vectores del virus vaccinia y virus Semliki Forest (SFV). Véase, Brent y col., (1995) citado anteriormente; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807; y Rosenfeld y col., (1992) *Cell* 68:143.

La elección del vector de expresión depende de las células huésped deseadas en las que se expresará el vector. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores) que están unidos operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena o fragmento de anticuerpo de LRP6. En algunas realizaciones, se emplea un promotor inducible para evitar la expresión de secuencias insertadas excepto en condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados pueden expandirse en condiciones no inductoras sin desviar a la población para codificar secuencias cuyos productos de expresión sean mejor tolerados por las células huésped. Además de los promotores, también pueden requerirse o desearse otros elementos reguladores para la expresión eficiente de una cadena o fragmento de anticuerpo de LRP6. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión a ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf y col., (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125; y Bittner y col., (1987) *Meth. Enzymol.*, 153:516) por ejemplo, el potenciador de SV40 o el potenciador de CMV pueden usarse para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpo de LRP6 insertadas. Más a menudo, las secuencias de anticuerpo de LRP6 insertadas se unen a una secuencia de señal antes de la inclusión en el vector. Los vectores a utilizar para recibir secuencias que codifican dominios variables de cadena ligera y pesada de anticuerpo contra LRP6 a veces también codifican regiones constantes o partes de las mismas. Dichos vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes, lo que conduce a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Típicamente, tales regiones constantes son humanas.

Las células huésped para albergar y expresar las cadenas del anticuerpo contra LRP6 pueden ser procariotas o eucariotas. *E. coli* es un hospedador procariota útil para clonar y expresar los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia* y varias especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariotas, también se pueden generar vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema

promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. Otros microbios, tales como levaduras, también se pueden emplear para expresar los polipéptidos LRP6 de la invención. También se pueden usar células de insectos en combinación con vectores de baculovirus.

En algunas realizaciones preferidas, las células huésped de mamífero se usan para expresar y producir los anticuerpos contra LRP6 de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógenos (por ejemplo, el clon de hibridoma de mieloma 1D6.C9 como se describe en los Ejemplos) o una línea celular de mamífero que alberga un vector de expresión exógeno (por ejemplo, las células de mieloma SP2/0 ejemplificadas a continuación). Estos incluyen cualquier célula animal o humana inmortal normal o anormal normal o mortal. Por ejemplo, se han desarrollado varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas que incluyen las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares Cos, células HeLa, líneas celulares de mieloma, células B transformadas e hibridomas. El uso del cultivo de células de tejido de mamífero para expresar polipéptidos se discute generalmente en, por ejemplo, Winnacker, *DE GENES A CLONES*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Los vectores de expresión para células huésped de mamífero pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen y col., (1986) *Immunol. Rev.* 89: 49-68), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional. Estos vectores de expresión habitualmente contienen promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos del tipo de célula, específicos de la etapa, y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen, pero sin limitaciones, el promotor metalotioneína, el promotor tardío principal adenovirus constitutivo, el promotor MMTV inducible con dexametasona, el promotor SV40, el promotor MRP polIII, el promotor constitutivo MPSV, el promotor CMV inducible con tetraciclina (tal como el promotor de CMV humano inmediato temprano), el promotor de CMV constitutivo y las combinaciones promotor-potenciador conocidas en la técnica.

Los procedimientos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación se puede usar para otros huéspedes celulares. (véase generalmente Sambrook, y col., citado anteriormente). Otros procedimientos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, procedimientos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, policación: conjugados de ácidos nucleicos, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural del virus del herpes VP22 (Elliot y O'Hare, (1997) *Cell* 88:223), captación de ADN potenciada por el agente y transducción ex vivo. Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, a menudo se desea una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable cadenas de anticuerpos contra LRP6 o fragmentos de unión se pueden preparar usando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes de replicación virales o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a medios selectivos. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células transfectadas establemente resistentes pueden proliferarse usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

(ii) Generación de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden producirse mediante diversas técnicas, incluida la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, (1975) *Nature* 256: 495. Se pueden emplear muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de los linfocitos B.

Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. También se conocen parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener a partir del hibridoma murino de interés y se puede modificar para que no contenga murino (*p.ej.*, humano) secuencias de inmunoglobulina usando técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas usando procedimientos conocidos en la materia (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4,816,567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones de CDR murinas pueden insertarse en un marco humano usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, La patente de Estados Unidos n.º 5225539 de Wintery las patentes de Estados Unidos n.º 5530101; 5585089; 5693762

y 6180370 de Queen et al.

En una determinada realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra LRP6 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en esta memoria como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones Ig humanos".

El HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) contiene inmunoglobulina humana miniloci que codifica secuencias de inmunoglobulina pesada humana (μ y γ) y de cadena ligera κ no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de la cadena μ y κ (véase, por ejemplo, Lonberg, y col., (1994) Nature 368 (6474): 856-859) Por consiguiente, los ratones exhiben expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos experimentan conmutación de clase y mutación somática para generar monoclonal de IgGk humano de alta afinidad (Lonberg y col., (1994) citado anteriormente; revisado en Lonberg, (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg y Huszar, (1995) Pasante. Rev. Immunol. 13: 65-93y Harding y Lonberg, (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764: 536-546) La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas llevadas a cabo por tales ratones, se describen con más detalle en Taylor y col., (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen y col., (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3720-3724; Choi y col., (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen y col., (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon y col., (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Taylor y col., (1994) International Immunology 579-591; y Fishwild y col., (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851.

Véanse además, las patentes de Estados Unidos n.º 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todas de Lonberg y Kay; la patente de Estados Unidos n.º 5,545,807 de Surani et al.; publicación PCT n.º WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todo para Lonberg y Kay; y publicación PCT n.º WO 01/14424 de Korman et al.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención se pueden generar utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas tales como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en el presente documento, "ratones KM", se describen en detalle en publicación PCT n.º WO 02/43478 de Ishida et al.

Todavía más, los sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para aumentar los anticuerpos contra LRP6 de la invención. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.). Tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 y 6,162,963 de Kucherlapati et al.

Además, los sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para aumentar los anticuerpos contra LRP6 de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka y col., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727. Además, las vacas que llevan transcromosomas de cadena pesada y ligera humana se han descrito en la técnica (Kuroiwa y col., (2002) Nature Biotechnology 20: 889-894) y puede usarse para aumentar los anticuerpos contra LRP6 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando procedimientos de presentación en fagos para explorar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Dichos procedimientos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos se establecen en la técnica o se describen en los ejemplos a continuación. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 de Ladner et al.; las patentes de Estados Unidos n.º 5,427,908 y 5,580,717 to Dower et al.; las patentes de Estados Unidos n.º 5,969,108 y 6,172,197 de McCafferty et al.; y las patentes de Estados Unidos n.º 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 de Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando ratones SCID en los que las células inmunes humanas se han reconstituido de manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5,476,996 y 5,698,767 de Wilson et al.

(iii) Ingeniería de marco o Fc

Los anticuerpos modificados genéticamente de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones a restos de marco dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo.

Típicamente, tales modificaciones de estructura se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "revertir" uno o más residuos del marco a la secuencia correspondiente de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos de estructura que difieren de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden identificarse comparando las secuencias de marco de anticuerpo con las secuencias de la línea germinal a partir de las cuales se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio. Tales anticuerpos "retromutados" también pretenden estar abarcados por la invención.

Otro tipo de modificación de marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región estructural, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítomos de células T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030153043 de Carr et al.

Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones estructurales, los anticuerpos de la invención pueden modificarse genéticamente para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida en suero, fijación del complemento, Fc unión al receptor, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede estar químicamente modificado (por ejemplo, uno o más restos químicos se pueden unir al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es la de Kabat (citado anteriormente).

En una realización, la región de bisagra de CH1 se modifica de modo que se altera el número de residuos de cisteína en la región de bisagra, por ejemplo, aumentado o disminuido. Este enfoque se describe más adelante en La patente de Estados Unidos n.º 5,677,425 de Bodmer y col., El número de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región de bisagra de Fc de un anticuerpo está mutada para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra de Fc de manera que el anticuerpo tiene un enlace de Staphylococcal protein A (SpA) deteriorado con respecto a la unión de SpA del dominio de bisagra nativo. Este enfoque se describe con más detalle en La patente de Estados Unidos n.º 6,165,745 de Ward et al.

En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden reemplazarse con un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector al que se modifica la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 de complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 5,624,821 y 5,648,260, both by Winter et al.

En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácidos pueden reemplazarse con un resto de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo ha alterado la unión a C1q y/o reducido o suprimido la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 6,194,551 de Idusogie et al.

En otra realización, uno o más residuos de aminoácidos se alteran para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe más adelante en la publicación PCT n.º WO 94/29351 de Bodmer et al.

En otra realización más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe más adelante en publicación PCT n.º WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγR1, FcγR2, FcγR3 y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields y col., (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604).

En otra realización más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por "antígeno". Tales modificaciones de hidratos de carbono pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal

aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 5,714,350 y 6,350,861 by Co et al.

Adicionalmente o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac bisectantes aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono pueden realizarse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden usar como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, EP 1,176,195 by Hang y col., describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofosilación. La publicación PCT n.º WO 03/035835 de Presta describe una variante de línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados a Asn (297), que también da como resultado la hipofosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields y col., (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). La publicación PCT n.º WO 99/54342 de Umana y col., describe líneas celulares diseñadas para expresar glicosiltransferasas que modifican glicoproteínas (por ejemplo, beta (1,4) -N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de forma tal que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiben un aumento de las estructuras de bicis GlcNac que da como resultado una mayor actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana y col., (1999) Nat. Biotech. 17: 176-180).

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en La patente de Estados Unidos n.º 6,277,375 hacia. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5,869,046 y 6,121,022 by Presta et al.

(iv) Procedimientos de Ingeniería de anticuerpos alterados

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos contra LRP6 que tienen secuencias VH y VL o secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa mostradas aquí pueden usarse para crear nuevos anticuerpos contra LRP6 modificando secuencias de cadena pesada y/o ligera de longitud completa, secuencias VH y/o VL, o la (s) región (regiones) constante (s) unida (s) a ellas. Por lo tanto, las características estructurales de los anticuerpos contra LRP6 descritos en el presente documento pueden usarse para crear anticuerpos contra LRP6 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional del anticuerpo de partida, tal como la unión a LRP6 humana y también la inhibición de una o más propiedades funcionales de LRP6. Por ejemplo, las regiones CDR se pueden combinar de forma recombinante con las regiones marco conocidas para crear anticuerpos contra LRP6 adicionales, diseñados por ingeniería recombinante, de la invención, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el procedimiento de ingeniería son las secuencias VH y/o VL proporcionadas aquí, o las regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo modificado, no es necesario prepararlo (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y/o VL proporcionadas aquí, o una o más regiones CDR de las mismas. Por el contrario, la información contenida en la (s) secuencia (s) se utiliza como material de partida para crear una (s) secuencia (s) de "segunda generación" derivada (s) de la (s) secuencia (s) original (es) y luego se prepara (n) la (s) secuencia (s) de "segunda generación". expresado como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la divulgación proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo 1 LRP6 de propulsor que consiste en: una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia CDR2 de SEQ ID NO: 2 y a Secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 3; y una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5, una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 6; alterar al menos un resto de aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresando la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

La secuencia de anticuerpo alterada también puede prepararse seleccionando bibliotecas de anticuerpos que tienen secuencias de CDR3 fijas o determinantes de unión esenciales mínimos como se describe en US20050255552 y diversidad en las secuencias de CDR1 y CDR2. El cribado puede realizarse de acuerdo con cualquier tecnología de cribado apropiada para cribar anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos, tal como tecnología de presentación en fagos.

Las técnicas estándar de biología molecular pueden usarse para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada. El anticuerpo codificado por la (s) secuencia (s) de anticuerpo alterada es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos contra LRP6 descritos en el presente documento, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no están limitadas a, unirse específicamente a humanos y/o cinomólogos

LRP6; el anticuerpo se une a LRP6 e inhibe la actividad biológica de LRP6 mediante la inhibición de la actividad de señalización de Wnt canónica en un ensayo de gen indicador Wnt.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden evaluarse usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en el presente documento, tales como los expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISAs).

En ciertas realizaciones de los procedimientos de ingeniería de anticuerpos de la invención, las mutaciones se pueden introducir de forma aleatoria o selectiva a lo largo de la secuencia codificante del anticuerpo contra LRP6 y los anticuerpos contra LRP6 modificados resultantes se pueden cribar para la actividad de unión y/o otras propiedades funcionales como se describe Aquí en. Los procedimientos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 02/092780 by Short describe procedimientos para crear y seleccionar mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis de saturación, ensamblaje de ligación sintética, o una combinación de los mismos. Alternativamente, publicación PCT n.º WO 03/074679 by Lazar y col., describe procedimientos para usar procedimientos de cribado computacional para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Caracterización de los anticuerpos de la invención

Los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse por diversos ensayos funcionales. Por ejemplo, pueden caracterizarse por su capacidad para inhibir la actividad biológica mediante la inhibición de la señalización de Wnt canónica en un ensayo del gen Wnt como se describe en el presente documento, su afinidad por una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 de ser humano y/o cinomoglífico), el agrupamiento de epítopos, su resistencia a la proteólisis y su capacidad para bloquear la ruta de Wnt. Además, los anticuerpos se caracterizan por la capacidad de potenciar una señal de Wnt en presencia de un ligando de Wnt. Se pueden usar varios procedimientos para medir la señalización Wnt mediada por LRP6. Por ejemplo, la ruta de señalización Wnt puede controlarse mediante (i) medición de la abundancia y localización de β -catenina; y (ii) medición de la fosforilación de LRP6 u otras proteínas de señalización de Wnt corriente abajo (por ejemplo, DVL), y (iii) medición de firmas de genes específicos o dianas génicas (por ejemplo, c-myc, Cyclin-D, Axin2).

La capacidad de un anticuerpo para unirse a LRP6 puede detectarse marcando directamente el anticuerpo de interés, o el anticuerpo puede no marcarse y la unión puede detectarse indirectamente usando diversos formatos de ensayo en sándwich conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los anticuerpos contra LRP6 de la invención bloquean o compiten con la unión de un anticuerpo contra LRP6 de referencia a un polipéptido LRP6. Estos pueden ser anticuerpos contra LRP6 completamente humanos descritos anteriormente. También pueden ser otros anticuerpos contra LRP6 de ratón, quiméricos o humanizados que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. La capacidad de bloquear o competir con la unión de anticuerpo de referencia indica que un anticuerpo contra LRP6 en prueba se une al epítipo igual o similar al definido por el anticuerpo de referencia, o a un epítipo que está suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia LRP6. Tales anticuerpos son especialmente propensos a compartir las propiedades ventajosas identificadas para el anticuerpo de referencia. La capacidad de bloquear o competir con el anticuerpo de referencia puede determinarse mediante, por ejemplo, un ensayo de unión competitiva. Con un ensayo de unión competitiva, el anticuerpo sometido a prueba se examina para determinar la capacidad de inhibir la unión específica del anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como un polipéptido LRP6. Un anticuerpo de prueba compite con el anticuerpo de referencia por la unión específica al antígeno si un exceso del anticuerpo de prueba inhibe sustancialmente la unión del anticuerpo de referencia. La inhibición sustancial significa que el anticuerpo de prueba reduce la unión específica del anticuerpo de referencia habitualmente en al menos un 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 90 %.

Hay una serie de ensayos de unión competitiva conocidos que se pueden usar para evaluar la competencia de un anticuerpo contra LRP6 con el anticuerpo de referencia LRP6 para unirse a una proteína LRP6. Éstas incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competencia sándwich (véase Stahl y col., (1983) *Methods in Enzymology* 9: 242-253); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (véase Kirkland y col., (1986) *J. Immunol.* 137: 3614-3619); ensayo etiquetado directo en fase sólida, ensayo en sándwich marcado en fase sólida en fase sólida (véase Harlow & Lane, citado anteriormente); RIA de etiqueta directa en fase sólida usando la etiqueta 1-125 (véase Morel y col., (1988) *Molec. Immunol.* 25: 7-15); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (Cheung y col., (1990) *Virology* 176: 546-552); y RIA etiquetado directo (Moldenhauer y col., (1990) *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82). Típicamente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estos, un anticuerpo contra LRP6 de prueba no marcado y un anticuerpo de referencia marcado. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie o células sólidas en presencia del anticuerpo de prueba. Por lo general, el anticuerpo de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos de competición) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca el impedimento estérico.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales LRP6 seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos disponibles comercialmente (por ejemplo, reactivos de Pierce, Rockford, IL). Los estudios de competición que usan anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados pueden realizarse usando placas de ELISA recubiertas con polipéptido LRP6. La unión de MAb biotinilado puede detectarse con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina. Para determinar el isotipo de un anticuerpo contra LRP6 purificado, se pueden realizar isotipos de ELISA. Por ejemplo, los pocillos de placas de microtitulación se pueden recubrir con 1 µg/ml de IgG antihumana durante la noche a 4 °C. Después de bloquear con BSA al 1 %, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos del anticuerpo monoclonal LRP6 o controles de isotipo purificado, a temperatura ambiente durante una o dos horas. Los pocillos pueden hacerse reaccionar con IgG1 humana o sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específicas de IgM humana. Las placas luego se desarrollan y se analizan para poder determinar el isotipo del anticuerpo purificado.

Para demostrar la unión de anticuerpos monoclonales contra LRP6 a células vivas que expresan un polipéptido LRP6, se puede usar citometría de flujo. Brevemente, las líneas celulares que expresan LRP6 (cultivadas en condiciones de crecimiento estándar) se pueden mezclar con diversas concentraciones de un anticuerpo contra LRP6 en PBS que contiene 0,1 % de BSA y 10 % de suero de ternera fetal, y se incuban a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo IgG antihumano marcado con fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar con un instrumento FACScan utilizando propiedades de luz y dispersión lateral para abrir en células individuales. Se puede usar un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia (además de o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia. Este procedimiento permite la visualización de células individuales, pero puede tener una sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

Los anticuerpos contra LRP6 de la invención se pueden analizar adicionalmente para determinar su reactividad con un polipéptido LRP6 o un fragmento antigénico mediante transferencia Western. Brevemente, se pueden preparar polipéptidos LRP6 purificados o proteínas de fusión, o extractos celulares de células que expresan LRP6 y someterlos a electroforesis en gel de dodecilsulfato de poliacrilamida sódica. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternera fetal al 10 % y se sondean con los anticuerpos monoclonales que se analizarán. La unión de IgG humana se puede detectar usando fosfatasa alcalina IgG antihumana y se puede desarrollar con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Los ejemplos de ensayos funcionales también se describen en la sección de Ejemplo a continuación.

Usos profilácticos y terapéuticos

La presente invención proporciona procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la ruta de señalización Wnt de LRP6 administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención. En una realización específica, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir cánceres (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de próstata, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas y melanoma administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para tratar o prevenir cánceres asociados con una vía de señalización de Wnt administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención.

En una realización, la presente invención proporciona procedimientos para tratar cánceres asociados con una vía de señalización Wnt que incluyen, entre otros, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de estómago, cáncer de próstata, enfermedad aguda leucemia mieloide, leucemia mieloide crónica, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas y melanoma.

Los agentes adecuados para el tratamiento de combinación con anticuerpos contra LRP6 incluyen agentes de cuidado estándar conocidos en la materia que son capaces de modular las actividades de la ruta de señalización de Wnt canónica (por ejemplo, agentes de PI3 quinasa).

Usos diagnósticos

En un aspecto, la invención abarca ensayos de diagnóstico para determinar la expresión de la proteína LRP6 y/o del ácido nucleico así como la función de la proteína LRP6, en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo, sangre, suero, células, tejido) o de un individuo afectado por cáncer, o está en riesgo de desarrollar cáncer.

Los ensayos de diagnóstico, como los ensayos competitivos, se basan en la capacidad de un análogo marcado (el "trazador") para competir con el analito de la muestra de ensayo por un número limitado de sitios de unión en un compañero de unión común. El compañero de unión generalmente está insolubilizado antes o después de la competencia y luego el trazador y el analito unidos al compañero de unión se separan del trazador y analito no unido. Esta separación se lleva a cabo mediante decantación (donde el compañero de unión se preinsolubilizó) o

mediante centrifugación (donde el compañero de unión se precipitó después de la reacción competitiva). La cantidad de analito de muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unido medido por la cantidad de sustancia marcadora. Se preparan curvas de dosis-respuesta con cantidades conocidas de analito y se comparan con los resultados de la prueba para determinar cuantitativamente la cantidad de analito presente en la muestra de prueba. Estos ensayos se denominan sistemas ELISA cuando las enzimas se usan como marcadores detectables. En un ensayo de esta forma, la unión competitiva entre anticuerpos y anticuerpos contra LRP6 da como resultado que la proteína LRP6 unida, preferentemente los epítomos LRP6, sea una medida de anticuerpos en la muestra de suero, más particularmente, inhibiendo anticuerpos en la muestra de suero.

Una ventaja significativa del ensayo es que la medición está hecha de anticuerpos inhibidores directamente (es decir, aquellos que interfieren con la unión de la proteína LRP6, específicamente, epítomos). Tal ensayo, particularmente en forma de una prueba de ELISA, tiene aplicaciones considerables en el entorno clínico y en el cribado sanguíneo de rutina.

La descripción también proporciona ensayos de pronóstico (o predictivos) para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la regulación alterada de la actividad de la ruta del complemento. Por ejemplo, las mutaciones en un gen LRP6 pueden analizarse en una muestra biológica. Dichos ensayos pueden usarse con fines de pronóstico o predictivos para tratar de ese modo profilácticamente a un individuo antes del inicio de un trastorno caracterizado por o asociado con la expresión o actividad de ácido nucleico de la proteína LRP6.

La descripción también proporciona procedimientos para determinar la expresión de ácido nucleico de LRP6 o la actividad de la proteína LRP6 en un individuo para seleccionar de ese modo agentes terapéuticos o profilácticos apropiados para ese individuo (denominado en el presente documento "farmacogenómica"). La farmacogenómica permite la selección de agentes (por ejemplo, fármacos) para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo en función del genotipo del individuo (por ejemplo, el genotipo del individuo examinado para determinar la capacidad del individuo para responder a un agente en particular).

La divulgación se refiere además a la monitorización de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos) sobre la expresión o actividad de la proteína LRP6 en ensayos clínicos.

Composiciones farmacéuticas

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen anticuerpos contra LRP6 (fragmentos intactos o de unión), los anticuerpos contra LRP6 (fragmentos intactos o de unión) se mezclan con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adecuados para tratar o prevenir el cáncer (cáncer de mama, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de próstata, leucemia mieloide aguda, mieloide crónica leucemia, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas y melanoma).

Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico se pueden preparar mezclando con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, soluciones acuosas, lociones o suspensiones (véase, por ejemplo, Hardman, y col., (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, N.Y.; Avis, y col., (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, y col., (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, y col., (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.).

La selección de un régimen de administración para un tratamiento terapéutico depende de varios factores, que incluyen la velocidad de renovación del suero o del tejido de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y el acceso a las células diana en la matriz biológica. En ciertas realizaciones, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico entregado al paciente consistente con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de biológico administrado depende en parte de la entidad particular y de la gravedad de la afección que se trata. Se encuentran disponibles orientaciones para seleccionar las dosis apropiadas de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kossina (ed.) (1991) Anticuerpos monoclonales, citoquinas y artritis, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y.; Bach (ed.) (1993) Anticuerpos monoclonales y terapia de péptidos en enfermedades autoinmunes, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y.; Baert, y col., (2003) New Engl. J. Med. 348: 601-608; Milgrom, y col., (1999) New Engl. J. Med. 341: 1966-1973; Slamon, y col. (2001) New Engl. J. Med. 344: 783-792; Beniaminovitz, y col. (2000) New Engl. J. Med. 342: 613-619; Ghosh, y col. (2003) New Engl. J. Med. 348: 24-32; Lipsky, y col. (2000) New Engl. J. Med. 343: 1594-1602).

La determinación de la dosis apropiada es realizada por el médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o sospechosos en la técnica para afectar el tratamiento o prever que afectarán el tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se incrementa en pequeños

incrementos a partir de entonces hasta que se alcanza el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen aquellas de los síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citoquinas inflamatorias producidas.

5 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de los mismos, la ruta de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente tratado, y como factores conocidos en las artes médicas.

15 Las composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se pueden proporcionar mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana o 1-7 veces por semana. Las dosis se pueden proporcionar por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosis específico es uno que implica la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita los efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total puede ser de al menos 0,05 µg/kg de peso corporal, al menos 0,2 µg/kg, al menos 0,5 µg/kg, al menos 1 µg/kg, al menos 10 µg/kg, al menos 100 µg/kg, al menos 0,2 mg/kg, al menos 1,0 mg/kg, al menos 2,0 mg/kg, al menos 10 mg/kg, al menos 25 mg/kg o al menos 50 mg/kg (véase, por ejemplo, Yang, y col., (2003) New Engl. J. Med. 349: 427-434; Herold, y col., (2002) New Engl. J. Med. 346: 1692-1698; Liu, y col., (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psicoanalizar. 67: 451-456; Portielji, y col., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 133-144) La dosis deseada de anticuerpos o fragmentos de los mismos es aproximadamente la misma que para un anticuerpo o polipéptido, en moles/kg de peso corporal. La concentración de plasma deseada de los anticuerpos o fragmentos de los mismos es aproximadamente, sobre la base de moles/kg de peso corporal. La dosis puede ser de al menos 15 µg al menos 20 µg, al menos 25 µg, al menos 30 µg, al menos 35 µg, al menos 40 µg, al menos 45 µg, al menos 50 µg, al menos 55 µg, al menos 60 µg, al menos 65 µg, al menos 70 µg, al menos 75 µg, al menos 80 µg, al menos 85 µg, al menos 90 µg, al menos 95 µg o al menos 100 µg. Las dosis administradas a un sujeto pueden ser de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o más.

Para anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención, la dosificación administrada a un paciente puede ser de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis puede estar entre 0.0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0.0001 y 2 mg/kg, 0.0001 y 1 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 0.5 mg/kg, 0.0001 mg/kg a 0.25 mg/kg, 0.0001 a 0.15 mg/kg, 0.0001 a 0.10 mg/kg, 0.001 a 0.5 mg/kg, 0.01 a 0.25 mg/kg o 0.01 a 0.10 mg/kg del peso corporal del paciente.

40 La dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se puede calcular usando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis a administrar en mg/kg. La dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención puede ser de 150 µg/kg o menos, 125 µg/kg o menos, 100 µg/kg o menos, 95 µg/kg o menos, 90 µg/kg o menos, 85 µg/kg o menos, 80 µg/kg o menos, 75 µg/kg o menos, 70 µg/kg o menos, 65 µg/kg o menos, 60 µg/kg o menos, 55 µg/kg o menos, 50 µg/kg o menos, 45 µg/kg o menos, 40 µg/kg o menos, 35 µg/kg o menos, 30 µg/kg o menos, 25 µg/kg o menos, 20 µg/kg o menos, 15 µg/kg o menos, 10 µg/kg o menos, 5 µg/kg o menos, 2.5 µg/kg o menos, 2 µg/kg o menos, 1.5 µg/kg o menos, 1 µg/kg o menos, 0.5 µg/kg o menos, o 0.5 µg/kg o menos del peso corporal de un paciente.

50 La dosis unitaria de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención puede ser de 0,1 mg a 20 mg, de 0,1 mg a 15 mg, de 0,1 mg a 12 mg, de 0,1 mg a 10 mg, de 0,1 mg a 8 mg, de 0,1 mg a 7 mg, de 0,1 mg a 5 mg, 0.1 a 2.5 mg, 0.25 mg a 20 mg, 0.25 a 15 mg, 0.25 a 12 mg, 0.25 a 10 mg, 0.25 a 8 mg, 0.25 mg a 7 mg, 0.25 mg a 5 mg, 0.5 mg a 2,5 mg, 1 mg a 20 mg, 1 mg a 15 mg, 1 mg a 12 mg, 1 mg a 10 mg, 1 mg a 8 mg, 1 mg a 7 mg, 1 mg a 5 mg o 1 mg a 2.5 mg.

55 La dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención puede alcanzar un título sérico de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml o al menos 400 µg/ml en un sujeto. Alternativamente, la dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención puede alcanzar un título sérico de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, en al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml o al menos 400 µg/ml en el sujeto.

65 Las dosis de anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención pueden repetirse y las administraciones

pueden separarse al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o al menos 6 meses.

Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se está tratando, la salud general del paciente, la ruta del procedimiento y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, Maynard, y col., (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

La vía de administración puede ser, por ejemplo, aplicación cutánea, inyección o infusión mediante sistemas intravenoso, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional o de liberación sostenida o un implante (véase, por ejemplo, Sidman y col., (1983) Biopolymers 22: 547-556; Langer, y col., (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277; Langer (1982) Chem. Tech. 12: 98-105; Epstein, y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688-3692; Hwang, y col. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030-4034; Las patentes de Estados Unidos n.º 6,350,466 y 6,316,024) Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Además, la administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante. Véase, por ejemplo, Las patentes de Estados Unidos n.º 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540y 4,880,078; y la publicación PCT n.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346y WO 99/66903.

Una composición de la presente invención también se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración seleccionadas para anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, inyección e infusión subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Alternativamente, una composición de la invención puede administrarse a través de una ruta no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o tópicamente. En una realización, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se administran por infusión. En otra realización, la proteína de unión a epítopo multiespecífica de la invención se administra por vía subcutánea.

Si los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se administran en un sistema de liberación sostenida o de liberación controlada, se puede usar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, 1987, CRC Crit Ref Biomed. Ing. 14:20; Buchwald y col., 1980, Surgery 88:507; Saudek y col., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574) Los materiales poliméricos se pueden usar para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, Aplicaciones médicas de liberación controlada, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984)); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy y col., 1985, Science 228:190; Durante y col., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard y col., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); patente de Estados Unidos n.º 5,679,377; patente de Estados Unidos n.º 5,916,597; patente de Estados Unidos n.º 5,912,015; patente de Estados Unidos n.º 5,989,463; patente de Estados Unidos n.º 5,128,326; publicación PCT n.º WO 99/15154; y la publicación PCT n.º WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, entre otros, poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), poli (metacrilato de metilo), poli (ácido acrílico), poli (etileno-co-acetato de vinilo), poli (metacrílico ácido), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli (N-vinilpirrolidona), poli (alcohol vinílico), poliacrilamida, poli (etilenglicol), polilactidas (PLA), poli (lactida-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable. Se puede colocar un sistema de liberación controlada o sostenida cerca del objetivo profiláctico o terapéutico, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, citado anteriormente, vol. 2, pp. 115-138 (1984))).

Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533)) Cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 4,526,938, la publicación PCT n.º WO 91/05548, la publicación PCT n.º WO 96/20698, Ning y col., 1996, " Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39: 179-189., Song y col., 1995, " Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397, Cleek y col., 1997, " Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854 y Lam y col., 1997, " Microencapsulation of Recombinant Humanized

Monoclonal Antibody for Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760.

Si los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se administran por vía tópica, se pueden formular en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, aerosol, aerosol, solución, emulsión u otra forma conocida para un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)) Para formas de dosificación tópicas no pulverizables, típicamente se emplean formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica, en algunos casos, mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas y similares, que se esterilizan o mezclan, si se desea, con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones), o sales) para influir sobre diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, en algunos casos, en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, como freón) o en una botella apretada. También se pueden añadir humectantes o humectantes a composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si las composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos se administran por vía intranasal, se pueden formular en forma de aerosol, pulverización, nebulización o en forma de gotas. Los procedimientos para la administración conjunta o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citoquina, esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación, son conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Hardman, y col., (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Poole y Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Una cantidad efectiva de terapia puede disminuir los síntomas en al menos 10 %; por al menos 20 %; al menos aproximadamente 30 %; al menos 40 %, o al menos 50 %.

Las terapias adicionales (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), que pueden administrarse en combinación con los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se pueden administrar con menos de 5 minutos de diferencia, con menos de 30 minutos de diferencia, con una hora de diferencia, con una separación de aproximadamente 1 hora, a aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas de diferencia, a aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de separación, a aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de separación, a aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de separación, a aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, a de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de separación, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de separación, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de separación, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de separación, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de separación, a de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, de aproximadamente 12 horas a 18 horas de separación, de 18 horas a 24 horas de separación, de 24 horas a 36 horas de separación, de 36 horas a 48 horas de separación, de 48 horas a 52 horas de separación, de 52 horas a 60 horas de diferencia, 60 horas a 72 horas de diferencia, 72 horas a 84 horas de diferencia, 84 horas a 96 horas de diferencia, o 96 horas a 120 horas aparte de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención. Las dos o más terapias se pueden administrar en una misma visita al paciente.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención y las otras terapias pueden administrarse cíclicamente. La terapia de ciclismo implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, opcionalmente, seguido de la administración de una tercera terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y demás, y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo para reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias, para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se pueden formular para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los procedimientos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, Las patentes de Estados Unidos n.º 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así la administración dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685) Los restos de dirección de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5,416,016 de Low et al); manósidos (Umezawa y col., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (por ejemplo, G. Bloeman y col., (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais y col., (1995) Antimicrob. Agentes Chemother. 39:180); receptor de proteína A surfactante (Briscoe y col., (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134); p 120 (Schreier y otros (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); ver también K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

La descripción proporciona protocolos para la administración de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención solos o en combinación con otras terapias para un sujeto que lo necesita. Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se pueden administrar concomitantemente o secuencialmente a un sujeto. La terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) también se puede administrar cíclicamente. La terapia de ciclismo implica la administración de un primer tratamiento (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguido de la administración de un segundo tratamiento (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y repetición esta administración secuencial, es decir, el ciclo, para reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias (por ejemplo, agentes) para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (por ejemplo, agentes) y/o mejorar, la eficacia de las terapias.

Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se pueden administrar a un sujeto al mismo tiempo. El término "concurrentemente" no se limita a la administración de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente al mismo tiempo, sino que se entiende que una composición farmacéutica que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos de la invención pueden actuar junto con la otra terapia o terapias para proporcionar un beneficio incrementado que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada terapia puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia se puede administrar a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier ruta adecuada. En diversas realizaciones, las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un sujeto a menos de 15 minutos, menos de 30 minutos, con menos de 1 hora de diferencia, con una separación de aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia., a aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de separación, a aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de separación, a aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de separación, a aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de separación, a aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de separación, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de separación, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de separación, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de separación, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de separación, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, Con 24 horas de diferencia, 48 horas de diferencia, 72 horas de diferencia o 1 semana de diferencia. En otras realizaciones, se administran dos o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) dentro de la misma visita al paciente.

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto por la misma o diferentes vías de administración.

Habiéndose descrito completamente la invención, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que son ilustrativos y no pretenden ser más limitantes.

Ejemplos

Procedimientos y materiales

1: Pannings, identificación y caracterización de anticuerpos

(a) Panning

(i) Panning HuCAL GOLD®

Para la selección de anticuerpos que reconocen LRP6 humana se aplicaron varias estrategias de cribado. Los anticuerpos terapéuticos contra la proteína LRP6 humana se generaron mediante la selección de clones que tenían altas afinidades de unión, utilizando como fuente de proteínas variantes de anticuerpos una biblioteca de presentación en fago disponible comercialmente, la biblioteca MorphoSys HuCAL GOLD®.

La biblioteca de fagémidos se basa en el concepto HuCAL® (Knappik y col., (2000) J Mol Biol 296: 57-86) y emplea la tecnología CysDisplay™ para mostrar el Fab en la superficie del fago (documento WO01/05950 de Lohning).

En detalle, la biblioteca HuCAL GOLD® utilizada en el proyecto actual se describe en (Rothe y col., (2007) J Mol Biol) O fagémidos producidos con el fago auxiliar VCSM13 o producidos con Hyperphage (Rondot y col., (2001) Nat Biotechnol 19: 75-78) se usaron para la selección de anticuerpos anti-LRP6.

(ii) Panning de célula entera contra LRP6

Para *panning* de células completas, se usó la línea celular HEK293-hLRP6ΔC-eGFP que expresaba el fragmento amino terminal (aminoácido 1-1482) de LRP6 fusionado a eGFP. Los fagemidos de anticuerpos HuCAL GOLD®
 5 específicos se eluyeron después de la incubación en la línea celular que expresa LRP6, seguido de la adsorción posterior a las células HEK293-LRP5/6-shRNA. El sobrenadante que contiene el fago HuCAL resultante se tituló en *E. coli* Células TG1 y rescatadas después de la infección de *E. coli* Células TG1 usando fago auxiliar. La producción del fago amplificado policlonal se tituló de nuevo y se usó en etapas de selección consecutivas.

(iii) Panning de captura de Fc contra LRP6

Para *panning* de captura de Fc, se incubaron fagos bloqueados con LRP6-Fc capturado con Fc y se lavaron los fagos inespecíficos usando diferentes concentraciones de PBST y PBS en diferentes momentos.

15 El fago restante se eluyó y se usó inmediatamente para la infección de *E. coli* Bacteria TG1. La amplificación, la producción del fago y la determinación del título de salida se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente en la selección de células completas frente a LRP6.

(iv) Panning diferencial de células enteras contra LRP6

20 Se realizaron *panning* de células completas diferenciales con selección de anticuerpos en células HEK293-hLRP6ΔC-eGFP y selección en LRP6-Fc humano recombinante como se ha descrito anteriormente para panoramas de células completas y barridos de captura de Fc.

25 Durante el proceso de selección, los fagos inespecíficos se eliminaron usando diferentes concentraciones de PBS y PBST para diferentes períodos de tiempo.

Infección por fagos de TG1 de *E. coli*, la amplificación, la producción de fagos y la determinación del título de salida se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente en la selección de células completas frente a LRP6.

(v) Panning de semi-solución contra LRP6

Para *panning* de semi-solución, LRP6-Fc humana recombinante y BSA se unieron covalentemente a M-280-Dynabeads activadas por tosilo.

35 Los fagos previamente depurados se incubaron con perlas recubiertas con LRP6 en un rotador. A continuación se recogieron las perlas usando un separador magnético y se lavaron con PBST y PBS. Los fagos unidos a las perlas se eluyeron y se usaron inmediatamente para la infección por bacterias TG1 *E. coli*. La infección por fagos, amplificación, producción de fagos y determinación del título de salida se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente en el *panning* de células enteras frente a LRP6.

(b) Subclonación y microexpresión de fragmentos Fab seleccionados

45 Para facilitar la expresión rápida de Fab soluble, los insertos de codificación Fab del fago HuCAL GOLD® seleccionado se subclonaron en un vector de expresión pMORPH®X9_FH o pMORPH®X9_FS. Después de la transformación de TG1-F, la expresión de clones individuales y la preparación de extractos periplásmicos que contenían fragmentos de HuCAL®-Fab se realizaron tal como se ha descrito anteriormente (Rauchenberger). y col., (2003)).

2: Cribado**(i) Cribado FACS en células HEK293-hLRP6ΔC-eGFP**

55 Los clones seleccionados por las estrategias de *panning* de células enteras, *panning* diferencial de células enteras y *panning* de semisolución se cribaron mediante citometría de flujo en células HEK293-hLRP6ΔC-eGFP y células HEK293-LRP5/6-shRNA para contracribado. Las coincidencias primarias de la estrategia de *panning* captura de Fc como se ha descrito anteriormente también se analizaron mediante citometría de flujo.

60 Las células se recogieron a una confluencia del 70 al 80 %, se resuspendieron en tampón de FACS y se tiñeron con lisados de células bacterianas en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo en U. La unión del anticuerpo se reveló con anticuerpos de detección conjugados con fluorocromo. Las células teñidas se lavaron dos veces y se midió y analizó la intensidad media de fluorescencia usando un instrumento FACSArray (Becton Dickinson).

(ii) Cribado de captura de Fc en LRP6-Fc humano recombinante

65 Los clones seleccionados en el *panning* de captura de Fc se cribaron en una configuración de captura de Fc-ELISA.

Se recubrieron placas de 384 pocillos Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, EE. UU.) con IgG antihumana de cabra, anticuerpo específico de fragmento Fc. Después de lavar con PBST y bloquear los pocillos, se añadió LRP6-Fc humano recombinante. Después de lavar las placas revestidas, se añadieron lisados celulares y se detectaron fragmentos Fab unidos usando IgG anti-IgG de cabra conjugada con AP (ab')₂ con el sustrato AttoPhos. La fluorescencia se leyó a 535 nm usando un lector de placas Tecan Plate Reader.

3: Expresión y purificación de anticuerpos HuCAL®-Fab en E. coli

La expresión de fragmentos Fab codificados por pMORPH®X9_Fab_FH o pMORPH®X11_Fab_FH en células TG-1 se indujo mediante la adición de IPTG. Las células se rompieron usando lisozima y fragmentos Fab aislados mediante cromatografía de Ni-NTA (Bio-Rad, Alemania). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante espectrofotometría UV. La pureza de los fragmentos Fab se analizó en estado desnaturalizado reducido usando SDS-PAGE y en estado nativo por HP-SEC.

4: Determinación de afinidad

(i) Mediciones de Resonancia de Plasmón Superficial

Para la determinación de los valores de K_D se aplicó tecnología de resonancia de plasmón superficial. Se usó un chip CM5 anti-captura humana de Fc (Biacore, Suecia) para capturar LRP6-Fc-Fusion seguido de inyección de ligando (Fab) a diferentes concentraciones.

(ii) Procedimiento de valoración de equilibrio de solución (SET) para la determinación de la K_D usando Sector Imager 6000 (MSD)

Para la determinación de la K_D por valoración de equilibrio de solución (SET), se usaron fracciones monoméricas de proteína de anticuerpo (al menos 90 % de contenido de monómero, analizado por SEC analítica; Superdex75 (Amersham Pharmacia) para Fab, o Tosoh G3000SWXL (Tosoh Bioscience) para IgG, respectivamente).

La determinación de la afinidad en solución se realizó básicamente como se describe en la literatura (Friguet y col., (1985) J Immunol Methods 77: 305-319) Para mejorar la sensibilidad y la precisión del procedimiento SET, se transfirió del ELISA clásico a la tecnología basada en ECL (Haenel y col., (2005) Anal Biochem. 339: 182-184).

Los datos se evaluaron con el software XLfit (IDBS) aplicando modelos de adaptación personalizados. Tenedor_{re} determinación de moléculas Fab, se utilizó el modelo de ajuste (según Haenel y col., *citado anteriormente*), modificado según Abraham y col., (1996) Journal of Molecular Recognition 9: 456-461.

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_i} \left([Fab]_i + x + K_D - \sqrt{([Fab]_i + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_i} \right) \right)$$

[Fab]_i: concentración de Fab total aplicada

x: concentración de antígeno soluble total aplicada (sitios de unión)

B_{máximo}: señal máxima de Fab sin antígeno

K_D: afinidad

5: Cribado después de la maduración de afinidad

Determinación de CE₅₀ en células HEK293T/17

Los valores de CE₅₀ se determinaron en células parentales HEK293T/17 en mediciones de FACS. Una curva de titulación de anticuerpos típica contenía de diez a doce diluciones de anticuerpos diferentes, y las valoraciones comenzaron a concentraciones de aprox. 150 a 200 µg/ml (concentración final). Las células se recogieron usando Accutase, se resuspendieron en tampón FACS, se distribuyeron a los pocillos de una placa de 96 pocillos y se tiñeron con diluciones de anticuerpos. CE₅₀ los valores se determinaron con el programa GraphPad Prism usando un análisis de regresión no lineal.

6: Conversión a IgG

Para expresar IgG de longitud completa, se subclonaron fragmentos de dominio variable de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de vectores de expresión Fab en vectores pMORPH®_hIg apropiados para IgG2 humana, IgG4 humana, IgG4_Pro humana y IgAL1 de IgG1 humana.

7: Expresión transitoria y purificación de IgG humana

Se transfectaron células eucariotas HKB11 con cantidades iguales de vector de expresión de cadena pesada y ligera IgG (pMORPH2) o ADN de vector de expresión que codificaba cadenas pesadas y ligeras de IgG (pMORPH4). Después de la filtración estéril, la solución se sometió a cromatografía de afinidad de proteína A estándar (MabSelect SURE, GE Healthcare). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante espectrofotometría UV. La pureza de IgG se analizó en condiciones desnaturalizantes, reductoras y no reductoras en SDS-PAGE o mediante el uso de Agilent BioAnalyzer y en estado nativo por HP-SEC.

8: Ensayo de gen indicador de Wnt

La capacidad de los anticuerpos anti-LRP6 para inhibir la señalización de Wnt se ensayó en un ensayo del gen indicador de luciferasa sensible a Wnt1 y Wnt3a. Las células se estimularon con medio condicionado Wnt3a o por cotransfección de Wnt 1, Wnt3a u otros plásmidos de expresión de Wnt.

(i) Ensayo del gen indicador de Wnt3a con medio acondicionado

Se sembraron 10^4 células HEK293-STF/pocillo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos y las células se incubaron durante la noche a 37 °C/5 % de CO₂ en 100 µl de medio.

Al día siguiente, se prepararon diversas diluciones de anticuerpo anti-LRP6 y diluciones DKK1 (control positivo) en medio puro o diluido en Wnt3a. Se eliminaron 60 µl/pocillo del sobrenadante de la placa de cultivo tisular de 96 pocillos y se sustituyeron por 60 µl/pocillo de las diluciones acondicionadas de medio/anticuerpo.

Después de la incubación durante 16 a 24 horas a 37 °C/5 % de CO₂, Se añadieron 100 µl de reactivo BrightGlo luciferasa (Promega) y las placas se incubaron durante 10 min. Para la lectura de luminiscencia (Tecan Plate Reader), los lisados celulares se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos (Costar, n.º de cat. 3917).

También se puede realizar un ensayo similar usando cocultivo de células que sobreexpresan Wnt3 o Wnt3a (por ejemplo, células CHO-K1, TM3, L o HEK293).

(ii) Ensayo de gen indicador Wnt1/Wnt3a con células transfectadas transitoriamente

Se sembraron 3×10^4 células HEK293T/17/pocillo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (Costar), y las células se incubaron a 37°C/5 % de CO₂ en 100 µl de medio como se describe en Tabla 3. Después de 12 a 16 h, las células se transfectaron con el vector de expresión Wnt de plásmido vacío 1 ng/pocillo; pTA-Luc-10xSTF (construcción de luciferasa de Firefly) 50 ng/pocillo; o phRL-SV40 (constructo de luciferasa de Renilla) 0,5 ng/pocillo.

Se preparó una premezcla de transfección (10 µl/pocillo) que contenía los plásmidos enumerados anteriormente y 0,2 µl de FuGene6/pocillo (Roche). La premezcla de transfección se incubó 15 min a TA y luego se distribuyó en los pocillos. La placa se balanceó a 400 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente y luego se incubó durante 4 horas a 37 °C/5 % de CO₂. Mientras tanto, los anticuerpos se diluyeron en medio y se añadieron a las células transfectadas (75 µl/pocillo).

Después de 18 a 24 horas, se añadieron 75 µl/pocillo del reactivo DualGlo Luciferasa (Promega) y la placa se sacudió durante 10 minutos para la lisis celular antes de la lectura de la actividad luciferasa de Firefly. Después de la lectura de luminiscencia, se añadieron 75 µl/pocillo del reactivo DualGlo Stop & Glow (Promega) y se midió nuevamente la luminiscencia para determinar la actividad de luciferasa de Renilla.

Para el análisis, se calculó la relación entre la actividad luciferasa de Firefly y la actividad luciferasa de Renilla. Para CI₅₀-determinación de los anticuerpos anti-LRP6, los valores relativos de luciferasa se analizaron usando GraphPad Prism.

También se puede realizar un ensayo similar usando cocultivo de Wnt1 u otras células que sobreexpresan ligando Wnt1 (por ejemplo, células CHO-K1, TM3, L o HEK293).

9: Estudios de reactividad cruzada FACS

La reactividad entre especies para LRP6 murino y cinomólogo se determinó en células mediante análisis FACS. La tinción de FACS se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente. Se usaron células U266 humanas (sin expresión de LRP6) como control negativo.

Se analizó la reactividad cruzada con LRP6 murino en células NIH-3T3 murinas. La reactividad cruzada con cinomolgo LRP6 se probó en la línea celular de monos cinomolgos Cynom-K1 y en células HEK293T/17 transfectadas transitoriamente:

Para analizar la reactividad cruzada de monos cinomolgos en la línea celular humana HEK293T/17, las células se transfectaron transitoriamente usando Lipofectamina (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se transfectaron con una mezcla del plásmido de expresión de LRP6 de ser humano pCMV6_XL4_LRP6 y el plásmido pc ADN 3.1-flag_MESD que codifica chaperona o con una mezcla de pc ADN 3.1-nV5-DEST cynoLRP6 y pc ADN 3.1-flag_MESD (sobreexpresión de cinomolgo LRP6). Se usaron 50 µg de plásmido de expresión de LRP6 y 20 µg de plásmido de expresión de MESD por matraz T175. Después de 24 h, las células se separaron y se tiñeron con el anticuerpo de control de LRP6 de cabra antihumano (R & D Systems) y con anticuerpos HuCAL anti-LRP6. Las células HEK293T/17 transfectadas de manera simulada se usaron para tinciones de control negativo (expresión de LRP6 endógena baja).

10: Optimización de aglutinante

Generación de bibliotecas de maduración de afinidad

Para aumentar la afinidad y la actividad biológica de los fragmentos de anticuerpos seleccionados, las regiones L-CDR3 y HCDR2 se optimizaron en paralelo mediante mutagénesis en casete usando mutagénesis dirigida por trinucleótidos, mientras que las regiones estructurales se mantuvieron constantes.

Las diferentes bibliotecas de maduración de afinidad se generaron mediante procedimientos de clonación estándar y la transformación de los clones diversificados en dispositivos electrocompetentes. *E. coli* Células TOP10F (Invitrogen). La secuenciación de clones elegidos al azar mostró una diversidad del 100 %. No se encontraron ligantes parentales entre los clones recogidos. Finalmente, el fago de todas las bibliotecas se preparó por separado.

11: Xenoinjertos de Wnt1 de MMTV

Los tumores de ratones transgénicos MMTV-Wnt1 se pasaron como fragmentos tumorales en la almohadilla de grasa mamaria de ratones FVB durante 5 pases antes de la implantación en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos. Once días después del implante, cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 110 mm³, los ratones se aleatorizaron en 3 grupos con 8 ratones por grupo y se dosificaron cada tres días (DeAlmeida y col. (2007); Cancer Res. 67: 5371-9).

12: Inhibición en ensayos bioquímicos

Las células HEK293 se cultivaron en D-MEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células se sembraron en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (Costar) a 3x10⁴/ pocillo y transfectado con 0,1 ng/pocillo de plásmido de expresión Wnt, 50 ng/pocillo de STF reportero, y 0,5 ng/ml de phRL-SV40 (Promega) mezclado con 0,2 µl/pocillo de FuGene6 (Roche). Cuatro horas después de la transfección, los anticuerpos se diluyeron en PBS y se añadieron a las células transfectadas. Después de 18 horas de incubación, se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y Renilla luciferasa usando reactivo DualGlo Luciferasa (Promega). La luciferasa de Renilla se usó para normalizar la eficacia de la transfección

Todos los formatos de IgG probados tienen una inhibición potente y completa de la señal canónica generada por Wnt1 (2,6, 7A, 7B, 9, 10A, 10B). Todos dan lugar a una curva de potenciación en forma de campana en presencia de una señal generada por Wnt3/3A.

13: Ensayo de competencia basado en FACS

Para el ensayo de competencia basado en FACS, los Fab anti-LRP6 y el Fab MOR03207 de control negativo se biotinilaron usando el módulo de biotinilación de proteína ECL (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los Fab biotinilados se usaron para teñir FACS en células HEK293-hLRP6AC-eGFP a una concentración de Fab constante (concentración final 20 nM) y se compitieron con un exceso molar de 100 veces de Fab no marcado. Las células se incubaron con las diluciones Fab durante 1 hora a 4 °C en un agitador de placas. Después de lavar las células 1x con tampón FACS, se incubaron con estreptavidina conjugada con PE (Dianova) durante 1 hora a 4°C en un agitador de placas en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se midió la fluorescencia usando FACS Array (BD). De forma similar, los Fab anti-LRP6 no biotinilados se compitieron con un exceso molar de 100 veces de la proteína SOST de LRP6 y se controló la unión de los Fab a las células mediante anticuerpo IgG antihumano conjugado con PE (Dianova).

14: Ensayo de inmunotransferencia

Se prepararon lisados celulares totales en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, SDS al 0,1 %, EDTA 1 mM). Los lisados se normalizaron para la concentración de proteína, se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sondearon con los anticuerpos indicados. El anticuerpo pT1479 LRP6 requiere la generación de extractos de membrana para lograr resultados satisfactorios. Para generar extractos de membrana, las células se lisaron en tampón hipotónico (Tris-HCl

10 mM, pH 7,5, KCl 10 mM) realizando cuatro ciclos de congelación-descongelación, y la fracción de membrana insoluble se solubilizó usando tampón RIPA. Cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma) y 1x cóctel de inhibidor de fosfatasa (Upstate) se añadieron a los tampones de lisis. Los anticuerpos comerciales utilizados en el ensayo de transferencia western incluyen anti-LRP6 de conejo, anti-pT1479 LRP6 de conejo y anticuerpos anti-pS 1490 LRP6 de conejo (Cell Signaling Technology).

Ejemplo 1: Unión específica de anticuerpos anti-LRP6 frente aa LRP6 endógena por FA CS

La detección de la expresión de la superficie celular endógena de LRP6 se examinó en un número de células tumorales usando los anticuerpos anti-LRP6 y el análisis FACS. Como se muestra en la Fig. 1A, las células PA1 expresan tanto ARNm de LRP5 como de LRP6, mientras que las células U266 y Daudi no expresan ARNm de LRP6. Las células PA1, pero no las células U266 y Daudi, muestran una tinción significativa con una IgG Propulsor 1 anti-LRP6. Más importante aún, las células U266 no son teñidas por el anticuerpo anti-LRP6, aunque expresan LRP6, demostrando la especificidad del anticuerpo anti-LRP6. Además, la tinción con anticuerpo anti-LRP6 de las células PA1 se reduce significativamente después de la depleción de LRP6 endógena usando ARNhc de LRP6, demostrando adicionalmente la especificidad del anticuerpo contra LRP6.

En estudios adicionales, la desactivación de LRP6 por ARNhc en células PA1 confirma adicionalmente la especificidad de los anticuerpos Prop1 y Prop3 para LRP6 (véase la Fig. 1B). El derribo se logró infectando células con lentivirus que codificaba un ARN de horquilla corta dirigido a LRP6 y seleccionando un grupo estable de células infectadas. El procedimiento de infección por ARNhc utilizado para el estudio se describe en Wiederschain y col., en 2009 Cell Cycle 8: 498-504. Epub 2009 Feb 25.

Ejemplo 2: Inhibición diferencial de los ensayos de gen indicador Wnt1 y Wnt3a para Fab anti-LRP6 de propulsor 1 y propulsor 2

Se probaron diferentes Fab anti-LRP6 en ensayos indicadores de Wnt *in vitro*. Los ligandos de Wnt1 o Wnt3A se expresaron transitoriamente en células HEK293T/17 STF (ensayo indicador de genes) y se trataron con concentraciones variables de fragmentos Fab anti-LRP6. Los ensayos STF se realizaron utilizando los protocolos descritos por Huang y col., (2009), Naturaleza; 461: 614-20. Epub 2009 Sep 16. Como se ve en la figura 2A, los Fab anti-LRP6 Propulsor 1 (MOR08168, MOR08545, MOR06706) redujeron específicamente la señalización dependiente de Wnt1 sin mucho efecto sobre la señalización dependiente de Wnt3A. Por el contrario, como se muestra en la figura 2B, los Fab anti-LRP6 Propulsor 3 (MOR06475, MOR08193, MOR08473) redujeron específicamente la señalización dependiente de Wnt3A sin efectos significativos sobre la señalización Wnt1 dependiente de Wnt1. Los resultados demuestran que **Wnt1** y las actividades de Wnt3A se bloquean por separado por diferentes fragmentos Fab de LRP6 (epítopes).

Ejemplo 3: Unión de anticuerpos anti-LRP6 frente a LRP6 de diferentes especies.

Para mostrar reactividad cruzada, se trataron células que expresan LRP6 endógena de origen humano (HEK293T/17) y de ratón (NIH3T3), o células HEK293T/17 transfectadas transitoriamente que expresan LRP6 de cinomolgo, y se sometieron a citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. La Figura 3 resume los resultados de los hallazgos de los resultados y muestra que todos los anticuerpos anti-LRP6 se unen a LRP6 de ser humano, de ratón y de mono cinomolgo.

Ejemplo 4: Clasificación de Wnt en función de su sensibilidad a los anticuerpos anti-LRP6 Propulsor 1 y Propulsor 3.

Para evaluar los Wnt basándose en su sensibilidad de los anticuerpos anti-LRP6 Propulsor 1 y Propulsor 3, se expresaron transitoriamente diversos ligandos de Wnt en células HEK293T/17 STF (ensayo de gen indicador) y se trataron con anticuerpos Propulsor 1 o Propulsor 3 anti-LRP6. Los ensayos STF se realizaron utilizando los protocolos descritos por Huang y col., (2009), Nature; 461: 614-20. Epub 2009 Sep 16. Los resultados se muestran en la Fig. 4 que representa la inhibición de la actividad de Wnts particular basado en la unión/bloqueo de anticuerpos a regiones de propulsores específicas de LRP6. La figura 4 muestra que la señalización inducida por Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt9, Wnt10A, Wnt10B puede inhibirse específicamente por Fab anti-LRP6 Propulsor 1, mientras que la señal inducida por Wnt3 y Wnt3A puede inhibirse específicamente por Propulsor 3 anti -LRP6 Fab.

Ejemplo 5: La conversión de anticuerpos contra LRP6 de fragmentos Fab a IgG potencia la señalización de Wnt inducida por la otra clase de Wnt.

En una observación bastante inesperada, la conversión de anticuerpos contra LRP6 de fragmentos Fab a IgG potencia la señalización WNT. Propulsor 1 anti-LRP6 IgG inhibe Wnt1-dependiente y potencia la señalización Wnt3A-dependiente en un 293T/17 STF reporter assay. De manera similar, Propulsor 3 anti-LRP6 IgG inhibe Wnt3A-dependiente y potencia la señalización Wnt1-dependiente como se muestra en la Fig. 5. Este hallazgo sugiere que la vía de señalización Wnt puede modificarse o "afinarse" usando los anticuerpos Propulsor 1 y Propulsor 3. Se observaron efectos similares en ensayos de indicador STF en otros fondos celulares (por ejemplo, células MDA-

MB231, MDA-MB435, PA-1, TM3 y 3t3 - datos no mostrados)

Ejemplo 6: Fab anti-LRP6 de propulsor 1 o propulsor 3 inhiben específicamente la fosforilación de LRP6 inducida por Wnt1 o Wnt3A.

Las células HEK293T/17 se transfectaron transitoriamente con plásmidos de expresión Wnt1 o Wnt3A y se trataron con Fab anti-LRP6 Propulsor 1 o Propulsor 3. Como se ve en la Fig. 6, los Fab anti-LRP6 de Propulsor 1 inhiben específicamente la fosforilación de LRP6 inducida por Wnt1, por ejemplo, los sitios T1479 y S1490 y los anticuerpos Propulsor 3 no lo hacen. Por el contrario, Propulsor 3 anti-LRP6 inhibe específicamente la fosforilación inducida por Wnt3A de LRP6 y los anticuerpos de Propulsor 1 no lo hacen. Estos resultados respaldan que los anticuerpos se unen a distintos dominios de propulsores de LRP6 y bloquean ligandos de Wnt específicos.

Ejemplo 7: Inhibición de la expresión del gen diana de Wnt en un modelo de xenoinjerto de tumor MMTV-Wnt1 usando una IgG anti-LRP6 Propulsor 1.

Los anticuerpos contra LRP6 se caracterizaron adicionalmente *in vivo* en un modelo de ratón reconocido genéticamente diseñado genéticamente conocido como MMTV-Wnt1. Se llevaron a cabo experimentos para determinar si los anticuerpos anti-LRP6 en el formato IgG podrían inhibir la señalización Wnt y el crecimiento tumoral *in vivo*. Los tumores mamarios derivados de ratones transgénicos MMTV-Wnt1 son dependientes de Wnt1; apagando la expresión de Wnt1 usando un sistema regulado por tetraciclina (Gunther) y *col.*, (2003), citado anteriormente) o bloquear la actividad Wnt usando Fz8CRDFc (DeAlmeida y *col.*, (2007) Cancer Research 67: 5371-5379) inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*. Para medir el efecto de los anticuerpos anti-LRP6 en la señalización de Wnt en tumores MMTV-Wnt1, a los ratones implantados con tumores MMTV-Wnt1 se les administró i.v. con una dosis única de 5 mg/kg de anticuerpo anti-LRP6 antagonista específico de clase Wnt1. Se analizaron las concentraciones séricas del anticuerpo así como la expresión de ARNm del gen objetivo de la β -catenina Axin2 durante un período de dos semanas. La semivida de fase β terminal del anticuerpo contra LRP6 fue de aproximadamente 108 horas. En correspondencia con la inyección de anticuerpo, se observó una disminución significativa de la expresión de ARNm de Axin2 en tumores, y la expresión de Axin2 se recuperó gradualmente una semana después de la inyección del anticuerpo cuando disminuyó el nivel de anticuerpo en suero. Estos resultados sugieren que el anticuerpo anti-LRP6 específico de Wnt1 suprime la señalización de Wnt en xenoinjertos MMTV-Wnt1 y esta supresión se correlaciona con la concentración de anticuerpo contra LRP6 en suero. Para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-LRP6 sobre el crecimiento tumoral, a los ratones se les dosificaron anticuerpos anti-LRP6 Propulsor 1-, Propulsor 3-específico o anticuerpos de control de isotipo coincidente. Los ratones fueron dosificados i.v. con una dosis inicial de 20 mg/kg, seguida cada tercer día con 10 mg/kg. En este experimento, Propulsor 1, pero no el anticuerpo anti-LRP6 específico de Propulsor 3, causó la regresión del tumor. En conjunto, estos resultados demuestran que el anticuerpo anti-LRP6 específico de Propulsor 1 induce la regresión de los xenoinjertos MMTV-Wnt1,

Los xenoinjertos de tumor MMTV-Wnt1 en ratones atímicos se trataron con MOR08168, una IgG anti-LRP6 Propulsor 1 en diferentes puntos de tiempo que varían de 1 hora a 14 días. La Fig. 7 muestra una correlación inversa con la concentración en suero de PK del anticuerpo y la expresión de ARNm del gen objetivo Wnt Axin2. Los niveles de expresión del gen Axin2 en tumores se inhiben con el tratamiento con MOR08168 y regresan a medida que el anticuerpo se elimina del suero.

Además de Axin2, se evaluó el efecto de MOR08168 en la expresión de genes adicionales. Affymetrix Mouse430 2.0 Se usaron arrays para perfilar un experimento de curso de tiempo de tumores de aloinjerto MMTV-Wnt1 más o menos una dosis única de MOR08168 (5 mg/kg). Hubo seis puntos de tiempo en total (0, 1, 3, 8, 24, 336 horas) y hubo tres repeticiones por punto de tiempo. En base a los datos que demuestran la inhibición máxima de Axin tras el tratamiento con anticuerpo, se eligió 8 h como el mejor punto de tiempo representativo para determinar los genes expresados diferencialmente que respondían putativamente a la inhibición de la vía Wnt. Se utilizó el marco R/Bioconductor y se empleó el paquete Limma para determinar genes expresados diferencialmente entre el punto de tiempo de 0 horas y el punto de tiempo de 8 horas. Se utilizó un valor de P ajustado de 0.05 como umbral para determinar el conjunto de genes expresados diferencialmente. En función de este límite, existen 1270 conjuntos de sondas llamados mapeo diferencial expresado en 972 genes. La Fig. 8A es una tabla que muestra genes que se regularon por aumento > 2 veces con un valor de P ajustado de <0,01 y la Fig. 8B es una tabla que muestra genes que se regularon por disminución > 2 veces con un P-valor ajustado de < 0,01.

Ejemplo 8: Actividades antitumorales de los anticuerpos Propulsor 1 y Propulsor 3 anti-LRP6 en el modelo de aloinjerto MMTV-Wnt1.

La actividad antitumoral de los anticuerpos LRP6 Propulsor 1 y 3 se evaluó en el modelo de aloinjerto MMTV-Wnt1. Se implantaron fragmentos tumorales MMTV-Wnt1 por vía subcutánea (s.c.) en ratones atímicos hembra. 11 días después de la implantación, los ratones portadores de tumores MMTV-Wnt1 (n = 8, promedio de 121 mm³; rango: 100-147 mm³) fueron tratados con vehículo IgG (10 mg/kg, por vía intravenosa (iv), cada tres días (q3d), LRP6-Propulsor 1 Ab MOR08168 (10 mg/kg, iv, q3d), o LRP6-Propulsor 3 Ab MOR06475 (10 mg/kg, iv, q3d), y los tumores calipados cada tres días. LRP6-Propulsor 1 MOR08168 Ab regresiones tumorales inducidas dependientes de la

dosis (-55 %, $p < 0,05$) (Véase la Fig. 9).

Ejemplo 9: Actividades antitumorales de los anticuerpos Propulsor 1 y Propulsor 3 anti-LRP6 en el modelo de aloinjerto MMTV-Wnt3.

La actividad antitumoral de los anticuerpos contra la Propela 1 y 3 de LRP6 se evaluó en el modelo de aloinjerto MMTV-Wnt3. Se implantaron fragmentos tumorales MMTV-Wnt3 por vía subcutánea (s.c.) en ratones atímicos hembra. 15 días después de la implantación, ratones portadores de tumores MMTV-Wnt3 ($n = 6$, promedio 209 mm³; rango: 113-337 mm³) fueron tratados con vehículo IgG (10 mg/kg, por vía intravenosa (iv), dos veces por semana (2qw), MOR08168 LRP6-Propulsor 1 Ab (3 mg/kg, iv, qw) o MOR06475 LRP6-Propulsor 3 Ab (10 mg/kg, iv, 2qw) y tumores calipados dos veces por semana. MOR06475 LRP6-Propulsor 3 Ab demostró actividad antitumoral (T/C = 34 %, $p < 0,05$) (Véase la Fig. 10).

Ejemplo 10: Evaluación de la capacidad de los anticuerpos anti-LRP6 Propulsor 1 y 3 para inhibir Wnt3A in vivo

La capacidad de los anticuerpos LRP6-Propulsor 1 y 3 para inhibir la señalización Wnt de la clase Wnt3 *in vivo* se probó en un sistema de co-implante que consiste en células informadoras PA1-STF co-implantadas con células L secretoras de Wnt3A. Se implantaron ratones hembra desnudos por vía subcutánea con 10x10e6 células PA1-STF y 0,5x10e6 células L-Wnt3A y se aleatorizaron en grupos de 5,24 horas más tarde, los ratones recibieron una única dosis intravenosa de vehículo, MOR08168 LRP6-Propulsor 1 Ab (10 mg/kg), o MOR06475 LRP6-Propulsor 3 Ab (10 mg/kg) y se obtuvieron imágenes por Xenogen 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 168 horas más tarde. MOR06475 fue capaz de inhibir la señalización inducida por Wnt3a durante al menos 72 horas, mientras que Mor08168 aumentó la señalización inducida por Wnt3A (figura 11).

Ejemplo 11: Mapeo de epítopes de LRP6 PD3/4 y su complejo de anticuerpos por HDx MS

Para identificar los sitios de unión de anticuerpos dentro de la región YWTD-EGF de Propulsor 3, se empleó espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDx). Los dominios de propulsor LRP6 3-4 (PD3/4) tienen 12 cisteínas y 4 sitios de glucosilación unidos a N. Los 4 sitios de glicosilación unidos a N se colocan en el dominio Propulsor 3 (631-932). Por HDx MS, se asignó una cobertura cercana al 100 % (cantidad de proteína para la que se pudo obtener información estructural) en el dominio Propulsor 4 y una cobertura de aproximadamente 70 % en el dominio Propulsor 3. Las regiones que rodean inmediatamente a los 4 sitios glicosilados permanecen sin detectar (Fig. 12A). En presencia de Fab 06745, se encontraron 2 péptidos protegidos con disolvente débil en Propulsor 3 (Phe⁶³⁶-Leu⁶⁴⁷, Tyr⁸⁴⁴-Glu⁸⁵⁶; Fig. 11A). Esto sugiere que los residuos o una fracción de los residuos responsables del epítipo están en los péptidos protegidos o espacialmente cerca. En base a la estructura cristalina de LRP6 PD34, las regiones protegidas con solvente corresponden a la superficie cóncava entre las palas 1 y 6 de la Proposición 3.

Mutaciones que interrumpen la interacción de ScFv06475 con LRP6 PD34

Para confirmar que el borde de la cuchilla 1 y 6 es responsable de la inhibición mediada por anticuerpos de la señalización Wnt3a, se construyeron una serie de mutaciones de superficie LRP6 (R638A, W767A, Y706A/E708A, W850A/S851A, R852/R853A y D874A/Y875A) que también cubrió aproximadamente la región implicada por HDx en unión. Para garantizar que las proteínas mutantes se plegaran adecuadamente, se realizó un ensayo de fusión térmica con dispersión de luz estática diferencial (DSLS). El experimento de desnaturalización de temperatura mostró que la temperatura de agregación, T_{agg} , (la temperatura a la que se desnaturaliza el 50 % de la proteína) de proteínas de tipo silvestre y mutantes fue similar. Por lo tanto, las mutaciones no tuvieron ningún efecto sobre el plegamiento o la estabilidad de la proteína.

La capacidad de unión de LRP6 mutante a scFv MOR06475 se determinó mediante ELISA. La mutación de los residuos (R638, W850/S851 y R852/R853) que están localizados en los péptidos que mostraron protección del disolvente en experimentos HDx MS también mostraron una disminución espectacular en la unión del anticuerpo (véase la Fig. 12B). La mutación de los residuos (Y706/E708) que están localizados en los péptidos que no muestran protección del disolvente en HDx tampoco mostró cambios en la capacidad de unión del anticuerpo (Fig. 11B). Por lo tanto, los datos del ensayo de unión están en buen acuerdo con la interfaz de unión mapeada por HDx MS, lo que sugiere que los residuos R638, W850, S851, R852 y R853 participan directamente en el epítipo.

En conjunto, estos resultados muestran que las diferentes proteínas Wnt requieren diferentes regiones Propulsor de LRP6 para la señalización. La clase Wnt 1 de proteínas Wnt (Wnt1, 1, 2, 6, 7A, 7B, 9, 10A, 10B) requiere el propulsor 1 de LRP6 para la señalización de Wnt1, y pueden inhibirse por los anticuerpos anti-LRP6 específicos de Propulsor 1. La clase Wnt 3A de proteínas Wnt (Wnt3 y Wnt3a) requiere el Propulsor 3 de LRP6 para la señalización de Wnt3, y pueden inhibirse por los anticuerpos anti-LRP6 específicos de Propulsor 3 (Fig. 13). Otro hallazgo inesperado fue la actividad potenciadora de Wnt de los anticuerpos en el formato de IgG bivalente en presencia de ligandos de Wnt. Todos los anticuerpos analizados en formato IgG potenciaron la señalización Wnt1 o Wnt3A en el ensayo del gen indicador STF Luc. Curiosamente, la mayoría de los Fab que inhibieron Wnt1 y estaban inactivos en el ensayo

Wnt3A, todavía inhibieron Wnt1 como una IgG, pero potenciaron la señalización de Wnt3A y viceversa. La mayoría de los Fab que inhiben Wnt3A potenciaron la actividad de Wnt1 como una IgG. El efecto fue independiente del formato IgG, ya que se probaron varios formatos (IgG 1LALA, IgG2, IgG4, IgG4_Pro). Estos datos muestran que diferentes proteínas Wnt se unen a diferentes hélices de LRP6 para la señalización. La dimerización de LRP6 usando anticuerpos bivalentes LRP6 no es suficiente para estimular la señalización Wnt por sí misma, pero puede potenciar la señalización Wnt iniciada por la otra clase de proteínas Wnt. Estos hallazgos demuestran que diferentes ligandos Wnt canónicos usan sitios de unión distintos en LRP6 y que todos los anticuerpos bivalentes potencian la actividad Wnt en formato IgG en presencia del Fab Wnt no bloqueado (anticuerpos monocatenarios, unicuerpos). Las estructuras monovalentes de cualquier tipo como formato final eluden la potenciación de Wnt. Alternativamente, la construcción de una molécula bi-específica IgG o similar a IgG que porta la actividad inhibidora de Wnt1 y Wnt3A evita la potenciación. Por lo tanto, las construcciones de anticuerpos contra LRP6 se pueden diseñar para controlar y "ajustar" la ruta de Wnt

Ejemplo 12: Generación de un anticuerpo biparatópico LRP6

Este ejemplo describe la producción y caracterización de anticuerpos biparatópico anti-LRP6 IgG-scFv. Diversos scFv anti-LRP6 que contienen diferentes orientaciones de dominio (por ejemplo, VH-VL o VL-VH) y diferentes longitudes de enlazador (por ejemplo, (Gly)₄Ser)₃ o (Gly₄Ser)₄) fueron inicialmente expresados, purificados y caracterizados. En base a los resultados del estudio scFv, se prepararon diferentes scPv anti-LRP6 biparatópico y se evaluaron adicionalmente. El scFv se puede colocar en varias posiciones dentro de la IgG que incluye el extremo C de CH3 o CL y el extremo N de VH o VL. Además, se pueden usar diversos enlazadores para conectar el scFv al IgG, incluido Gly₄Ser y (GlyGlySer)₂.

(a) Materiales y procedimientos

(i) Generación de scFv anti-LRP6

Los genes que codifican todas las variantes de scFv fueron sintetizados por Geneart. Fragmentos de ADN que codifican scFv en ambas orientaciones (VH-VL y VL-VH, separados por dos enlazadores diferentes: (Gly)₄Ser)₃ y (Gly₄Ser)₄, con secuencia señal N-terminal y C-terminal 6xHis-tag) se clonaron directamente de vectores Geneart a través de NdeI/XbaI en el vector pFAB15-FkpA, las construcciones resultantes se denominaron pFab15-MOR06475-VH- (Gly₄Ser)₃-VL, pFab15-MOR06475-VH- (Gly₄Ser)₄-VL, pFab15-MOR06475-VL- (Gly₄Ser)₃-VH, pFab15-MOR06475-VL- (Gly₄Ser)₄-VH, pFab15-MOR08168-VH- (Gly₄Ser)₃-VL, pFab15-MOR08168-VH- (Gly₄Ser)₄-VL, pFab15-MOR08168-VL- (Gly₄Ser)₃-VH, pFab15-MOR08168-VL- (Gly₄Ser)₄-VH, pFab15-MOR08545-VH- (Gly₄Ser)₃-VL, pFab15-MOR08545-VH- (Gly₄Ser)₄-VL, pFab15-MOR08545-VL- (Gly₄Ser)₃-VH y pFab15-MOR08545-VL- (Gly₄Ser)₄-VH.

(ii) Generación de IgG-scFv anti-LRP6 biparatópico

anti-LRP6 MOR08168 hlgG1LALA 6475scFv

El vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA que contiene la secuencia VH optimizada en codones (sintetizada por Geneart) se usó como fuente para la generación de construcciones biparatópicas. Inicialmente, se introdujo el sitio Afel mediante mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene) en el extremo 3' de la secuencia que codifica hlgG1LALA (cebador n° 1: 5'-agcgtgatgcacgaagcgtgcacaaccactac-3' (SEQ ID NO: 213) y el cebador no. 2: 5'-gtagtgtgtgtgcagcgcttcgtgcacacgctg-3' (SEQ ID NO: 214)). Gene codificación para MOR06475scFv (VL-VH-orientation, separado por (Gly₄Ser)₄-linker) fue sintetizado por Geneart. 5'-cebador que contiene el sitio Afel y la secuencia que codifica para (GlyGlySer)₂ - el enlazador así como el cebador 3' que contiene el sitio Ascl se usaron para la amplificación del gen MOR06475 - scFv completo (cebador n. ° 3: 5'-tgatgcacgaagcgtgcacaaccactacacccagaagagcctgagcctgtccccggcaag ggcggctccggcggaagcgatgc - 3' (SEQ ID NO: 215) y el cebador n. ° 4 : 5'-gagcggcgccgcccggcgccgccc tcatcagctggacactgtcaccaggg-3' (SEQ ID NO: 216)). El producto de PCR se clonó a continuación mediante Afel/Ascl en el vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA dando como resultado la construcción final pRS5a MOR08168 hlgG1LALA-6475sc-fv. La codificación genética para VL optimizada con codón de MOR08168 fue sintetizada por Geneart. El cebador 5' que contenía el sitio AgeI y el cebador 3' que contenía el sitio HindIII se usaron para la amplificación de genes MOR08168-VL completos (cebador n° 5: (5'-gcttccggacaccaccggt gacatcgagctgaccagcc-3' 'SEQ ID NO: 217) y primer n. ° 6: 5'-cagcagcgtaagctt ggtgcctccggcgaacaccag-3' (SEQ ID NO: 218)). El producto de la PCR se clonó luego mediante AgeI/HindIII en el vector pRS5a-hlambd dando como resultado la construcción final pRS5a MOR08168 hlambd.

anti-LRP6 MOR08168 hlgG1LALA 6475scFv sin Lys (K)

El vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA-6475scFv (SEQ ID NO: 165) se usó como ADN molde para la eliminación de Lysina C-terminal en CH3. Se usó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change XL (Stratagene) en combinación con los siguientes cebadores:

5'-ctgtccccggcgggcggtccggc-3' (SEQ ID NO: 219)

5'-gccggagccgcccgggggacag-3' (SEQ ID NO: 220)

La mutagénesis dirigida al sitio se realizó de acuerdo con el protocolo de Stratagene; la nueva construcción resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR08168opt 6475 scFv K.

El vector pRS5a MOR08168 hlambda (generación descrita para anti-LRP6_MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv) que contenía la secuencia VL optimizada por codones (sintetizada por Geneart) se usó sin modificaciones para la expresión de LC.

anti-LRP6 MOR08168 hlgG1LALA 6475scFv AspPro a AspA1a (DP a DA)

El vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA-6475scFv (SEQ ID NO: 165) se usó como ADN molde para la sustitución de DP por DA en VH de scFv. Se usó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change XL (Stratagene) en combinación con los siguientes cebadores:

5'-ccatgaccaacatggacccgtggacaccgccacc-3' (SEQ ID NO: 221)

5'-gggtggcgggtgtccacggcgtccatgtgtgtcatgg-3' (SEQ ID NO: 222)

Mutagénesis dirigida al sitio se realizó de acuerdo con el protocolo de Stratagene; la nueva construcción resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR08168opt 6475 scFv DP a DA. El vector pRS5a MOR08168 hlambda (generación descrita para anti-LRP6_MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv) que contenía la secuencia VL optimizada por codones (sintetizada por Geneart) se usó sin modificaciones para la expresión de LC.

anti-LRP6 MOR08168 hlgG1LALA 6475scFv AspPro a ThrAla (DP a TA)

El vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA-6475scFv (SEQ ID NO: 165) se usó como ADN molde para la sustitución de DP por TA en VH de scFv. Se usó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change XL (Stratagene) en combinación con los siguientes cebadores: 5'-caccatgaccaacatgaccgcccgtggacaccgccacc-3' (SEQ ID NO: 223) 5'-gggtggcgggtgtccacggcgtccatgtgtgtcatgg-3' (SEQ ID NO: 224)

Mutagénesis dirigida al sitio se realizó de acuerdo con el protocolo de Stratagene; la nueva construcción resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR08168opt 6475 scFv DP a TA.

El vector pRS5a MOR08168 hlambda (generación descrita para anti-LRP6_MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv) que contenía la secuencia VL optimizada por codones (sintetizada por Geneart) se usó sin modificaciones para la expresión de LC.

anti-LRP6 MOR08168 hlgG1 LALA 6475scFv en ValLeu (VL)

El vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA que contiene la secuencia VH optimizada en codones (sintetizada por Geneart) se usó sin modificaciones para la expresión de HC.

La codificación genética para MOR06475scFv y MOR08168-VL optimizados por codones se sintetizó mediante ADN 2.0 y se clonó mediante AgeI/HindIII en el vector pRS5a hlambda MOR08168. El vector resultante se denominó pRS5a hlambda MOR08168 6475scFv en VL.

anti-LRP6 MOR06475 hlgG1 LALA 8168scfv (VH-3-VL), donde 3 representa un (Gly₄Ser)₃ Enlazador de aminoácidos entre las cadenas VH y VL.

MOR06475-VH se amplificó a partir del vector pM2 hlgG1LALA MOR06475 con los siguientes cebadores:

5'-gttcctggtcgcatcctgaaggggtgcactgccaggtgcaattgaagaaagcg-3' (SEQ ID NO: 225)

5'-cttggtggaggctgagctaac-3' (SEQ ID NO: 226)

PCR-producto se clonó a través de NruI/B1pI en el vector pRS5a hlgG1LALA MOR08168

6475scFv, el vector resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR06475 6475scFv.

MOR08168scFv se amplificó a partir del vector pRS5a ScFv MOR08168 (VH-3-VL) con los siguientes cebadores:

**5'-gcacgaagcgtgcacaaccactacaccagaagagcctgagcctgtccccggcgaaggcggctccggcggaagc
caggttcaattggttgaagc-3' (SEQ ID NO: 227)**

5'-gggccctctagagcgccgcccggcgcgccctcatcacagaacggtgaagcttggtgcc-3' (SEQ ID NO: 228) El producto PCR se clonó mediante Afel/XbaI en el vector pRS5a hlgG1LALA MOR06475 6475scFv, dando como resultado el vector final pRS5a hlgG1LALA MOR06475 8168scFv (VH-3- VL).

MOR06475-VL se amplificó a partir del vector pM2 hkappa MOR06475 con los siguientes cebadores:

5'-gacaccaccggtgatctgctgacctgacccagagc-3' (SEQ ID NO: 229)

5'-gcagccaccgtacgtttaattcaac-3' (SEQ ID NO: 210)

El producto de PCR se clonó en el vector pRS5a hkappa MOR06654 a través de AgeI/BsiWI, el vector resultante se denominó pRS5a hkappa MOR06475.

anti-LRP6 MOR06475hlgG1 LALA 8168scfv (VH-4-VL), donde 4 representa un (Gly₄Ser)₄ Enlazador de aminoácidos entre las cadenas VH y VL.

MOR06475-VH se amplificó a partir del vector pM2 hlgG1LALA MOR06475 con los siguientes cebadores:

5'-gttcctggtcgcatcctggaaggggtgactgccaggtgcaattgaaagaaagcg-3' (SEQ ID NO: 211)

5'-cttggtgaggtgagctagactaac-3' (SEQ ID NO: 212)

El producto de la PCR se clonó mediante NruI/B1pI en el vector pRS5a hlgG1LALA MOR08168 6475scFv, el vector resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR06475 6475scFv.

MOR08168scFv se amplificó a partir del vector pRS5a ScFv MOR08168 (VH-4-VL) con los siguientes cebadores:

5'-gcacgaagcgctgcacaaccactacaccagaagagcctgagcctgtcccccggcgaagggcggtccggcggaagc
caggttcaattggttgaagc-3' (SEQ ID NO: 213)

5'-gggccctctagagcgccgcccggcgcgccctcatcacagaacggtgaagcttggtgcc-3' (SEQ ID NO: 214) El MOR06475-VL se amplificó a partir del vector pM2 hkappa MOR06475 con los siguientes cebadores:

5'-gacaccaccggtgatctgctgacctgacccagagc-3' (SEQ ID NO: 215)

5'-gcagccaccgtacgtttaattcaac-3' (SEQ ID NO: 216)

El producto de PCR se clonó en el vector pRS5a hkappa MOR06654 a través de AgeI/BsiWI, el vector resultante se denominó pRS5a hkappa MOR06475.

(iii) Expresión de anti-LRP6-scFv

La cepa W3110 de E. coli electrocompetente se transformó con ADN plasmídico. Los precultivos (150 ml de medio LB que contienen 12,5 µg de tetraciclina/ml y 0,4 % de glucosa, en un matraz de 500 ml) se inocularon con una única colonia y se incubaron durante la noche a 37 °C/230 rpm. Los cultivos de expresión (6x 500 ml de medio SB que contiene 12,5 µg de tetraciclina/ml, en un matraz de 2 l) se inocularon con precultivos a DO600 de 0,1 y se incubaron a 25 °C/230 rpm hasta una DO600 de aprox. 0,6. Luego se añadió IPTG (Roche) a una concentración final de 0,4 mM y los cultivos se incubaron durante la noche a 25 °C/230 rpm. Las células se recogieron por centrifugación (20 min a 4600 rpm, 4 °C) y los sedimentos celulares se congelaron a -20 °C.

(iv) Purificación de anti-LRP6-scFv

Los sedimentos de 31 expresiones se suspendieron en 50 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 20 mM, imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4; 1 tableta completa sin EDTA por 50 ml de tampón, Roche n.º 11836170001, MgSO₄ 10 mM).₄ y Benzonase). Las suspensiones celulares se trataron con French Press (2x a 1000 bar) y se centrifugaron durante 30 min a 16000xg, 4 °C. Se equilibró 1 ml de columna HisTrap HP (GE Healthcare) con 10 ml de Lysis-Buffer. Los sobrenadantes se filtraron a través de Stericup Filter (Millipore) y se cargaron en una columna equilibrada (1 ml/min). La columna se lavó con Lysis-Buffer (20 ml) y la proteína unida se eluyó con 3 ml de Elution-Buffer (como Lysis-Buffer pero 250 mM Imidazol). Eluato se cargó directamente en la columna Superdex75 (HiLoad 16/60, GE-Healthcare), equilibrada con 130 ml de PBS (1 ml/min). La ejecución se realizó con PBS a 1 ml/min, el eluato se recogió en fracciones de 1,5 ml y se analizó en Bis-Tris-Gel al 10 % (NuPage, Invitrogen). Las fracciones adecuadas se agruparon, se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenaron a 4 °C. Todas las proteínas purificadas se analizaron por LC-MS (con muestras oxidadas y reducidas) y por SEC-MALS (análisis de agregación).

(v) Expresión transitoria de anti-LRP6 IgG-scFv biparatópico

3.2 Se cultivaron células HEK293-6E en medios M1V3: Lote # D07668B en un BioWave20 en Rocks 10 rpm, ángulo 7 °, aireación 25 L/h, O₂ 25 %, CO₂ 6 % a una densidad de 2E6 células viables/mL. Las células se transfectaron transitoriamente con 1,8 l de ADN: PEI-MIX (plásmido: pRS5a MOR08168 hlgG1 LALA-6475sc-Fv 5 mg + pRS5a MOR08168 hlambda 5 mg + 20 mg PEI). 6 horas después de la transfección, se añadieron 5 l de medio de alimentación (Novartis) con Yeastolate: lote # 09-021 al cultivo. Las células fueron posteriormente cultivadas en Rocks 24 rpm, ángulo: 7 °, aireación 25 l/h, O₂ 25 %, CO₂ 0-6 %. Siete días después de la transfección, las células se eliminaron por filtración de flujo cruzado usando filtros Fresenius de 0,2 µm. Posteriormente, el material libre de células se concentró a 1,75 l con filtración de flujo cruzado usando un filtro de corte de 10 kDa de Fresenius. Después de la concentración, el concentrado se filtró en condiciones estériles a través de un filtro de esterificación (0,22 µm). El sobrenadante estéril se almacenó a 4 °C. Todas las variantes biaparatópicas anti-LRP6-scFv descritas se expresaron de manera similar.

(vi) Purificación de IgG-scFv anti-LRP6 biparatópica

La purificación de la IgG biparatópica se realizó en un sistema de cromatografía de aire ÄKTA 100 explorer a 6 °C en un armario de enfriamiento, utilizando una columna XK16/20 recién saneada (NaOH 0,2 M/30 % de isopropanol) con 25 ml de MabSelect autoenvasado Resina SuRe (todos GE Healthcare). Todos los caudales fueron de 3,5 ml/min, a excepción de la carga, a un límite de presión de 5 bar. La columna se equilibró con 3 CV de PBS (fabricado a partir de 10x, Gibco), luego el sobrenadante de fermentación filtrado concentrado y estéril (1,35 l) se cargó a 2,0 ml/min o/n. La columna se lavó con 8 CV de PBS. A continuación, la IgG se eluyó con un gradiente de pH, comenzando con citrato 50 mM, NaCl 70 mM, pH 4,5, yendo linealmente hacia abajo en 12 CV a citrato 50 mM, NaCl 70 mM, pH 2,5, seguido de un paso constante de 2 CV del mismo buffer pH 2.5. La IgG biparatópica se eluyó durante el gradiente en un único pico simétrico alrededor de pH 3,8 y se recogió en fracciones de 4 ml. Las fracciones se agruparon en tres grupos, pendiente izquierda, pico principal y pendiente derecha. Los grupos se valoraron inmediatamente a pH 7,0, lentamente y bajo agitación, usando Tris 2 M, pH 9,0. Los grupos se filtraron de forma estéril (Millipore Steriflip, 0,22 µm), se midió OD 280 nm en un espectrómetro Lambda 35 (Perkin Elmer), y la concentración de proteína se calculó en base a los datos de secuencia. Las agrupaciones se analizaron por separado para la agregación (SEC-MALS) y la pureza (SDS-PAGE y MS) y, basándose en los resultados, solo se utilizó adicionalmente la combinación central (35 ml a 2,55 mg/ml de proteína). Todas las variantes biaparatópicas anti-LRP6-scFv descritas se purificaron de manera similar.

(vii) Análisis de reactividad cruzada por microarrays de proteínas

Las micromatrices eran chips de proteína de alta densidad hechos a medida fabricados por Protagen AG (UNlchip® AV-VAR-EP) y contenían 384 proteínas humanas predefinidas y purificadas impresas por cuadruplicado en un portaobjetos de vidrio recubierto de nitrocelulosa. Las proteínas se clasifican como proteínas extracelulares o secretoras basadas en la ontología genética y se expresan como una proteína de fusión His-tag N-terminal usando *Escherichia coli*, y se purificó usando cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC). La hibridación del anticuerpo se realizó utilizando la estación de hibridación TECAN HS400Pro, programada con un protocolo desarrollado por Protagen AG. Los anticuerpos primarios se analizaron a una concentración final de 5 µg/ml. El anticuerpo secundario marcado, un AffiniPure Cabra anti-hsIgG F conjugado con Cy5 (ab ')₂, fragmento específico (Jackson ImmunoResearch, código n. ° 109-175-097), se usó a una concentración final de 7,5 µg/ml. La adquisición de imágenes de microarrays se realizó usando un escáner de microarrays de fluorescencia GenePix Professional 4200A (Axon Instruments, CA) equipado con un láser rojo (635 nm). El análisis de la imagen se realizó utilizando el software GenePix Pro v6.0. El análisis de datos se realizó utilizando Protagen UNlchip® Data Analysis Tool v1.8. Para determinar la reactividad cruzada inespecífica derivada de la unión del anticuerpo secundario directamente a los antígenos impresos, el anticuerpo secundario también se incubó en el UNlchip® sin el uso del anticuerpo primario. Para la determinación del nivel de reactividad cruzada normalizado para el antígeno correspondiente, el valor de la intensidad de la señal fluorescente a la concentración saturada (20 fmol/punto) se estableció como 100 %. Todas las intensidades de señal para una proteína dada, que eran más del 4 % de la señal de antígeno, se consideraron como aciertos positivos, siempre que no se encontraran también en el control respectivo con solo el anticuerpo secundario marcado.

(viii) Estabilidad conformacional medida mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La DSC se midió utilizando un microcalorímetro de células capilares VP-DSC de Microcal, equipado con una placa automática de muestras profundas. Los datos fueron analizados con el software Origin 7.5. Las muestras (400 µl) se añadieron a placas de pocillos profundos de 2 ml de Nunc™. Las muestras en PBS pH 7,0 se analizaron a 1 mg/ml. La muestra de referencia contenía 400 µl del mismo tampón que el analito, habitualmente PBS. El cambio de calor asociado con la desnaturalización térmica se midió entre 20 °C y 100 °C, con una velocidad de calentamiento de 3.3 °C min⁻¹. La temperatura aparente de fusión (T_m), correspondió al punto medio de transición térmica, donde se desplegó el 50 % del analito.

(ix) Estudios de estabilidad sérica

Las proteínas purificadas se resolvieron en 35 µl de suero de rata o suero de ratón (Gene Tex) dando como resultado una concentración final de 0,3 mg/ml. Las muestras se incubaron a 37 °C en una incubadora de placas. Se tomaron 4 µl de cada muestra en diferentes puntos temporales, se añadieron 10 µl de tampón de muestra (4x, NuPage, Invitrogen) y 26 µl de agua y las muestras se congelaron a -20°C. 12 µl de cada muestra se cargaron en 12 % de Bis-Tris-Gel (NuPage, Invitrogen), la electroforesis se realizó a 200 V durante 35 min. La transferencia de la proteína se realizó a la membrana de PVDF (Invitrogen) en tampón Borato (Borato 50 mM, Tris 50 mM) a 30 V durante 1 h. Las membranas se lavaron brevemente en TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 0,1 mM, Tween80 al 0,1 %) y luego se incubaron durante 2 horas a RT/agitador en TBST que contenía 5 % de leche en polvo. Las membranas se lavaron brevemente en TBST y luego se incubaron durante 1 hora a RT/agitador en TBST que contenía IgG de cabra antihumana conjugada con POD, fragmento de Fab específico (Dianova), diluido 1: 10.000 o anti-His POD (Roche) diluido 1 : 500. Las membranas se lavaron tres veces durante 5 minutos a RT/agitador en TBST. La detección de señal se realizó con BM Blue POD Substrate (Roche) o ECL/ECL Plus (GE-Healthcare).

(b) Resultados

(i) Expresión, purificación y caracterización de anti-LRP6-scFv

Todos los scFv se expresaron con éxito en *E. coli* W3110 y se purificó por cromatografía de afinidad seguida de cromatografía de exclusión por tamaño. Tamaño esperado (MOR06475 (Gly)₄Ser)₃/(Gly)₄Ser)₄: 26,74 y 27,06 kDa respectivamente, MOR08168 (Gly)₄Ser)₃/(Gly)₄Ser)₄: 26.5 y 26.85 kDa respectivamente, MOR08545 (Gly)₄Ser)₃/(Gly)₄Ser)₄: Se confirmaron 25,99 y 26,31 kDa respectivamente para todas las muestras purificadas mediante análisis de LC-MS con muestras reducidas y oxidadas y mediante SDS PAGE. Se obtuvieron purezas > 95 %. La Fig. 14 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE en el que se cargaron 1,5 µg de cada proteína purificada en gel Bis-Tris al 10 % (NuPage, Invitrogen) M: Marker See Blue Plus2 (Invitrogen); (1): MOR06475-VH-(Gly)₄Ser)₄-VL; (2) MOR06475-VL- (Gly)₄Ser)₄-VH; (3) MOR08168-VH- (Gly)₄Ser)₄-VL; (4) MOR08168-VL-(Gly)₄Ser)₄-VH; (5) MOR08545-VH- (Gly)₄Ser)₄-VL; (6) MOR08545-VL- (Gly)₄Ser)₄-VH (7) MOR06475-VH-(Gly)₄Ser)₃-VL; (8) MOR06475-VL- (Gly)₄Ser)₃-VH (9) MOR08168-VH- (Gly)₄Ser)₃-VL; (10) MOR08168-VL-(Gly)₄Ser)₃-VH; (11) MOR08545-VH- (Gly)₄Ser)₃-VL; (12) MOR0854 5-VL- (Gly)₄Ser)₃-VH.

La estabilidad térmica se comparó para todos los ScFv por DSC. La temperatura de fusión (T_m) fue significativamente mayor para las variantes MOR06475. La T_m más alta (64.7 °C) se observó para MOR06475-VL-(Gly)₄Ser)₄-VH por lo tanto, se cree que esta molécula es potencialmente más estable que las otras construcciones producidas.

La actividad de los constructos MOR06475, MOR08168 y MOR08545 scFv y Fab, así como varios formatos biparatópicos se evaluaron en el ensayo HEK293 STF (Fig. 17 y 18). Colectivamente, los datos muestran que Propulsor 1 IgG (MOR08168) inhibe ligandos de Propulsor 1 como Wnt1, mientras que potencia ligandos de Propulsor 3 como Wnt3 en el ensayo de STF. El propulsor 3 scFv6475 inhibe los ligandos de Propulsor 3 tales como Wnt3, mientras que no tiene actividad sobre los ligandos de Propulsor 1 tales como Wnt1. Además, los anticuerpos biparatópicos MOR08168/6475 tienen actividad contra los ligandos Propulsor 1 y Propulsor 3, y no ejercen actividad potenciadora a ninguna concentración aplicada en el ensayo HEK W32 STN de HEK293.

(ii) Expresión, purificación y caracterización de biparatópico anti-LRP6 IgG-scFv

En la Fig. 15 se presenta una representación esquemática del formato biparatópico anti-LRP6 Ig-scFv producido en este estudio. La Fig. 15A representa un scFv scFv unido al C-terminal de una IgG; 15B scFv scFv unido al extremo N de un Fc; 15C representa un scFv scFv unido al C-terminal de un Fc; y 15D representa un scFv scFv unido al extremo N y C de un Fc.

El anticuerpo biparatópico en el experimento actual es el biparatópico full-IgG con scFv fusionado al C-terminal de hlgG1 LALA CH3. En este estudio particular, el scFv fue separado por un (GlyGlySer)₂-linker de la IgG completa. El scFv consiste en la orientación VL-VH con un (Gly)₄Ser)₄enlazador

Los scFv anti-LRP6 anti-Lipaptop6 se expresaron transitoriamente en células HEK293-6E y se purificaron por cromatografía de afinidad con elución en gradiente de pH 4,5 a 2,5. El tamaño esperado de 197,4 kDa se determinó por análisis de LC-MS y SDS-PAGE con una pureza superior al 97 %. La agregación, determinada por SEC MALS, fue menor al 5 %. La Fig. 16 es un análisis de SDS-Page de anti-LRP IgG-scFv biparatópico purificado. Las muestras se cargaron en gel de Bis-Tris al 12 % (NuPage, Invitrogen). Marcador: Invitrogen Mark12; (1): no reducido; (2): reducido

El scFv de IgG anti-LRP6 y la IgG anti-LRP6 parental unida a FcRn humano a pH 6.0 con una K_d de 0.021 y 0.023 µM respectivamente, según lo determinado por Biacore. Ambos formatos demostraron un bajo nivel de unión al FcRn humano a pH 7.4, por lo que se espera que este BpAb se comporte como un IgG estándar *in vivo* (Características PK similares a IgG1) (véase Fig. 19).

El scFv de IgG anti-LRP6 biparatópico fue estable tanto en suero de rata como de ratón a 37 °C, probado hasta 336 horas (datos no mostrados) y no mostró unión > 4 % cuando se evaluó en un Protancy Unichip personalizado que contenía 384 proteínas extracelulares purificadas o secretadas (datos no mostrados).

5 (c) Discusión

Diversos scFv anti-LRP6 se caracterizaron inicialmente para permitir la optimización del anticuerpo biparatópico final. ScFv en ambas orientaciones y con dos longitudes de enlazador diferentes se expresaron en *mi. coli*. Anti-LRP6 MOR06475, 8168 y 8545 se expresaron como VH-VL y VL-VH scFv con un (Gly₄Ser)₃ y (Gly₄Ser)₄ enlazador. Todas las variantes MOR06475 y MOR08168 se expresaron y purificaron con éxito con un bajo nivel (<5 %) de agregados. Se obtuvieron proteínas procesadas correctamente con los tamaños esperados. Los datos de estabilidad térmica mostraron que el formato de scFv más estable era MOR06475-VL- (Gly₄Ser)₄ - VH con una T_m de 64.7 °C. Todos los formatos examinados ScFv MOR08168 mostraron estabilidad térmica significativamente reducida con una T_m de 50-52 °C.

Las IgG anti-LRP6 biparatópicas con scFv en CH3 y VL, así como variantes modificadas (sin C-terminal Lys (K) en CH3, con sustituciones AspPro (DP) a AspAla (DA) y AspPro (DP) a ThrAla (TA) en VH de scFv) se expresaron con éxito y se purificaron con un bajo nivel (<5 %) de agregados del cultivo celular. Se determinaron los tamaños esperados de aproximadamente 197-198 kDa. Construcciones anti-LRP6 MOR08168 hlgG1LALA 6475scFv y anti-LRP6 MOR08168hlgG1 LALA 6475scFv en VL, así como construcciones mutadas (eliminación de C-terminal Lys (K) en CH3 y sustituciones AspPro (DP) a AspAla (DA) y AspAla (DP) a ThrAla (TA)) consistió en un scFv con orientación VL-VH y se separaron por un (Gly₄Ser)₄ enlazador A (GlyGlySer)₂ el enlazador se usó para unir el scFv al dominio CH3 de hlgG1 LALA y a VL de hlambda, respectivamente. Como se discutió previamente, sin embargo, el scFv también puede consistir en VH-VL separados por enlazadores alternativos, además el scFv también se puede unir usando enlazadores alternativos a otras posiciones dentro de la IgG incluyendo el C-terminal de CL y el N-terminal de VH.. Las construcciones con MOR08168scFv consistían en un scFv con orientación VH-VL y estaban separadas por un (Gly₄Ser)₃ y (Gly₄Ser)₄ enlazador A (GlyGlySer)₂ el enlazador se usó para unir el scFv al dominio CH3 de hlgG1 LALA.

El anti-LRP6 biparatópico MOR08168 hlgG1 LALA 6475scFv fue estable en suero (probado hasta 336 horas). El biparatópico se unió como se esperaba al FcRn humano a pH 6,0, se observó un nivel bajo de unión a pH 7,4. El anticuerpo parental se une con una cinética similar.

Ejemplo 13: Evaluación in vivo del anticuerpo anti-LRP6 biparatópico

Scfv MOR08168hlgG1LALA 6475

La capacidad del anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv para inhibir la señalización Wnt3 de la clase Wnt3 *in vivo* se probó en un sistema de co-implante que consiste en células informadoras PA1-STF co-implantadas con células L secretoras de Wnt3A. Se implantaron ratones hembra desnudos por vía subcutánea con 10x10e6 células PA1-STF y 0,5x10e6 células L-Wnt3A y se aleatorizaron en grupos de 5. 24 horas después, los ratones recibieron una sola dosis intravenosa de vehículo, MOR08168 LRP6-Propulsor 1 Ab (10 mg/kg), MOR06475 LRP6-Propulsor 3 Ab (10 mg/kg), o el anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv (1 mg/kg, 3 mg/kg, o 10 mg/kg) y se obtuvieron imágenes por Xenogen 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 168 horas después. El anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv mostró una inhibición relacionada con la dosis de señalización inducida por Wnt3A, con 1 mg/kg que muestra inhibición máxima a las 24 horas, regresando a la línea base a las 48 horas y mostrando 3 mg/kg y 10 mg/kg inhibición sostenida durante al menos 72 horas. El MOR06475 LRP6-Propulsor 3 Ab dosificado a 10 mg/kg pudo inhibir la señalización inducida por Wnt3a durante al menos 72 horas, mientras que MOR08168 LRP6-Propulsor 1 Ab dosificado a 10 mg/kg aumentó la señalización inducida por Wnt3a (Fig. 20).

Para medir el efecto del anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv, con respecto al MOR08168 LRP6-Propulsor 1 Ab, en la señalización de Wnt en tumores MMTV-Wnt1, se dosificaron ratones i.v. implantados con tumores MMTV-Wnt1. con una dosis única de 5 mg/kg del anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv o una dosis única de 5 mg/kg del anticuerpo MOR08168 LRP6-Propulsor 1. Las concentraciones séricas del anticuerpo biparatópico y el anticuerpo del propulsor 1, así como la expresión de ARNm del gen diana de la β- catenina Axin2, se analizaron durante un período de dos semanas. La semivida de fase β terminal del anticuerpo biparatópico fue de aproximadamente 48 horas, mientras que la del anticuerpo contra LRP6 fue de aproximadamente 72 horas. Se observó una disminución significativa de la expresión de ARNm de Axin2 en tumores obtenidos de ratones dosificados con el anticuerpo biparatópico o el anticuerpo de propulsor 1 y la expresión de Axin2 se recuperó gradualmente sin diferencias significativas observadas entre el anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv y el MOR08168 Anticuerpo contra LRP6-Propulsor 1 (Fig. 21).

Se evaluó la actividad antitumoral del anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv en el modelo de aloinjerto MMTV-Wnt1. Se implantaron fragmentos tumorales MMTV-Wnt1 por vía subcutánea (s.c.) en

ratones atímicos hembra. 7 días después de la implantación, ratones portadores de tumores MMTV-Wnt1 ($n = 8$, promedio 137 mm^3 ; rango: $81\text{-}272 \text{ mm}^3$) fueron tratados con vehículo IgG, MOR08168 LRP6-Propulsor 1 Ab (3 mg/kg , iv, qw), o anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv (3 mg/kg , iv, 2qw), y los tumores calipiados dos veces por semana. Tanto el anticuerpo MOR08168 LRP6-Propulsor 1 Ab como el anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv indujeron regresiones tumorales (-93% , $p < 0.05$ y -91% , $p < 0.05$ respectivamente) (Véase la Fig. 22). La dependencia de la dosis del anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv se evaluó y se representa en la Fig. 23.

La inhibición de la señalización de Wnt en células de cáncer colorrectal por ARNip de β -catenina o TCF-4 dominante negativo provoca un arresto rápido del ciclo celular e induce un programa de diferenciación intestinal (van der Wetering y col., (2002), Cell, 111, 241-250; van der Wetering y col., (2003), EMBO Reports, 4, 609-615) Para determinar si la inhibición de la señalización de Wnt por los anticuerpos antagonistas de LRP6 tiene consecuencias similares en los tumores mamarios MMTV-Wnt1 murinos, se examinó la diferenciación secretora mediante tinción con Oil Red O para lípidos, un componente principal de la leche. Ratones con tumor MMTV-Wnt1 se trataron con una sola dosis de PBS (control) o 5 mg/kg anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv 24 h, 72 ho 5 días después del tratamiento, se cortaron secciones de aloinjertos de tumor murino congelado a $5 \mu\text{m}$ de espesor. Los portaobjetos se secaron al aire durante 30-60 minutos a temperatura ambiente y luego se fijaron en formalina al 10% enfriada con hielo durante 5-10 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron inmediatamente tres veces en dH_2O . La tinción con Oil Red O se realizó usando un kit de tinción Oil Red O (Poly Scientific R & D, Cat # k043). Las diapositivas se escanearon con escáner ScanScope CS/GL (Aperio Technologies) y las secciones de tejido se analizaron con el software ImageScope v10.2.1.2315 (Aperio Technologies), utilizando el algoritmo de deconvolución de color IHC con un recuento de píxeles positivos. Las imágenes representativas de la tinción con Oil Red O se muestran en la Fig. 24A y la cuantificación en la Fig. 24B. El gráfico representa la media $\pm$ valores SEM. $n = 4$ en el grupo de 72 horas, $n = 3$ en el grupo de 24 horas, $n = 2$ en el grupo de 5 días y $n = 1$ para PBS (control) y demuestran un aumento en la tinción de Oil Red O durante el transcurso del tiempo experimentar. En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición de la señalización de Wnt en las células tumorales mamarias puede conducir a la detención del ciclo celular y la inducción de un programa de diferenciación secretora.

La actividad antitumoral del anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv se evaluó adicionalmente en el modelo de xenoinjerto mamario MDA-MB-231. Se implantaron 5×10^6 células MDA-MB-231 en matrigel al 50% por vía subcutánea (s.c.) en ratones atímicos hembra. 31 días después de la implantación, los ratones portadores de tumores MDA-MB-231 ($n = 7$, promedio de 165 mm^3 ; rango $99\text{-}238 \text{ mm}^3$) se trataron con vehículo, o anticuerpo biparatópico anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv (3 mg/kg , i.v., qw), y los tumores se calzaron dos veces a la semana. El anticuerpo anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv de anticuerpo biparatópico dosificado a 3 mg/kg semanalmente, retrasó significativamente el crecimiento tumoral ($\text{T/C} = 23 \%$, $p < 0,05$) (Véase la Fig. 25).

Ejemplo 14: Evaluación in vivo de anticuerpos biparatópicos adicionales en el modelo MMTV-Wnt1

Como se describe en el Ejemplo 10, se generaron anticuerpos biparatópicos inversos anti-LRP6 adicionales que consistían en el anticuerpo de propulsor 3 MOR06475 y los dominios de propulsor 1 ScFv MOR08168 del propulsor. La capacidad de estos anticuerpos biparatópico (MOR06475hlgG1 LALA_8168scfv_ (VH-3-VL) y MOR06475hlgG1 LALA_8168scfv_ (VH-4-VL) para inhibir la señalización Wnt1 *in vivo*, con respecto a MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv, se determinó en el modelo MMTV-Wnt1. Los ratones implantados con tumores MMTV-Wnt1 se dosificaron i.v. con una dosis única de 5 mg/kg de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. Las concentraciones séricas de cada anticuerpo (MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv, MOR06475hlgG1 LALA_8168scfv_ (VH-3-VL) y MOR06475hlgG1 LALA_8168scfv_ (VH-4-VL), así como la expresión del ARNm del gen objetivo de la β -catenina Axin2, se analizaron durante un período de 5 días (los puntos de tiempo evaluados fueron 0, 2, 7, 24, 72 y 120 h). Ambos anticuerpos biparatópicos inversos mostraron una disminución significativa en la expresión del ARNm de axin2 en la misma extensión máxima que MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv. La disminución de la expresión del ARNm de axin2 fue más corta que la observada con MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv, y la señal volvió a la línea de base en el punto temporal de 24 h para las dos moléculas biparatópicas inversas, lo que concuerda con la disminución de la exposición de estas moléculas. Por debajo de $5 \mu\text{g/ml}$ a las 24 h en comparación con 120 h para MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv.

Ejemplo 15: Afinidad de unión de un anticuerpo biparatópico por LRP6 PD1 /2 Y PD 3/4 recombinante

Las afinidades de unión de anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv, MOR08168 y MOR6475 a Propulsor Domains 1-2 de LRP6 (PD1/2, residuos de aminoácidos 19 a 629 de número de acceso NP002327) y dominios Propulsor 3-4 de LRP6 (PD3/4, aminoácidos 631-1246 del n° de registro NP002327) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un Biacore T-100 (GE Healthcare). Para las determinaciones de afinidad, se diluyó anticuerpo anti IgG Fcy humano antihumano (n° 109-005-098, Jackson Immunology) en tampón de acetato de sodio 10 mM ($\text{pH } 5,0$) y luego se inmovilizó en un chip CM4 (GE Healthcare, BR-1005- 34) para todas las células de 4 flujos a una densidad de -2000 RU usando química de acoplamiento de amina estándar. La superficie de carboximetil dextrano se activó con una inyección de 7 minutos de una relación 1: 1 de EDC $0,4 \text{ M}$ (hidrocloruro de 1-etil-3- [3-dimetilaminopropil] carbodiimida) y NHS $0,1 \text{ M}$ (*n*-hidroxisuccinimida). El exceso de ésteres reactivos se

bloquearon con etanolamina 1M. anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv se preparó a 10 µg/ml en tampón HBS-EP (GE Healthcare), y se capturó en una célula de flujo separada del chip CM4 a una densidad de ~70 RU a un caudal de 10 µl/min. PD1/2 y PD3/4 se prepararon como series de dos veces de concentración comenzando a 50 nM, y se inyectaron a 30 µl/min durante 1 minuto. Esto permitió una fase de disociación de 40 min sobre la superficie capturada con scfv anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 y la superficie de control sin ligandos capturados. Las superficies se regeneraron dos veces con glicina 10 mM (pH 2,2). Para el análisis de unión dual de anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv a PD1/2 y PD3/4, se capturó anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv en el chip CM4 inmovilizado con anticuerpo anti IgG Fcy humana. Luego se hizo fluir PD3/4 a una concentración de saturación de 100 nM sobre la superficie a una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 30 minutos. Se inyectó una concentración de saturación de 100 nM de PD1/2 inmediatamente después del PD3/4. La constante de disociación (K_D), asociación (k_{en}) y disociación ($k_{apagado}$) las tasas se calcularon a partir de las curvas de unión corregidas restadas de la línea de base utilizando el software BIAevaluation (GE Healthcare).

Se comparó anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA la unión de 6475 scfv (anticuerpo biparatópico) a PD1/2 y PD3/4 con la de MOR08168 (anticuerpo de propulsor 1) y MOR6475 (anticuerpo de propulsor 3). La Fig. 26A muestra las afinidades de las moléculas correspondientes a los dominios del receptor LRP6, PD1/2 y PD3/4. La K determinada de anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv para PD1/2 y PD3/4 fue similar a la de MOR08168 a PD1/2 y MOR6475 a PD3/4, respectivamente. La Fig. 26B muestra las fases de asociación y disociación de anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv que se une a cada una de las proteínas. La velocidad de liberación para la unión de anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv a PD1/2 es más lenta que la de PD3/4. Otros estudios demostrados en los que PD1/2 y PD3/4 se inyectaron secuencialmente indicaron que, como se esperaba, anti-LRP6 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv era capaz de unirse a ambas construcciones de dominio de propulsor (Fig. 26C).

Ejemplo 16: Mutaciones de scFv para mejorar la termoestabilidad de scFv08168 y scFv06475

Este ejemplo describe mutaciones hechas en los scFv de los anticuerpos del propulsor 1 y del propulsor 3 y el efecto del individuo y una combinación de mutaciones para la estabilidad del scFv como se determina por la estabilidad térmica. Las mejoras en la estabilidad del scFv se pueden traducir a la estabilidad global de una construcción de anticuerpo que comprende el scFv mutado.

Material y procedimientos

Construcciones

Para moléculas biparatópicas basadas en IgG, scFv06475 se fusionó con el terminal C de MOR08168 IgG1 a través de un enlazador GlyGlySer para hacer que el anticuerpo biparatópico designado "901" en la Fig. 27 (MOR08168IgG1LALA 6475 scfv), o scFv08168 se fusionara con el C-terminal de MOR06475 IgG1 a través de un engarce GGS para hacer que el anticuerpo biparatópico se denomine "902" en la Fig. 27.. Para información detallada, consulte otras partes de esta solicitud de patente.

Diseño racional de la biblioteca enfocada para scFv06475 y scFv08168

Se usaron dos enfoques para la selección de mutaciones puntuales para estabilizar scFv06475 y scFv08168: análisis de consenso de secuencia y diseño de mutación basado en estructura usando modelado de homología en Molecular Operating Environment (MOE).

Para el análisis de consenso de secuencia, las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de scFv06475, y de los dominios VH y VL de scFv08168 se BLAST contra la base de datos de secuencia de proteína no redundante de NCBI. Después de cada ejecución de BLAST, la secuencia de consulta y las 250 secuencias homólogas superiores se alinearon mediante el programa clustalW. Se usó un programa informático interno para contar el aminoácido más común en cada posición de residuo entre las secuencias alineadas. En cada posición donde el aminoácido en la secuencia de consulta difería del aminoácido más común en el conjunto de secuencias alineadas, se diseñó una mutación para mutar el residuo de su aminoácido de tipo salvaje al aminoácido más común.

Un modelo de homología de scFv06475 y un modelo de homología de scFv08168 se construyeron en MOE. Las secuencias se leyeron primero en el módulo "editor de secuencia" de MOE. Las estructuras de rayos X existentes con secuencias homólogas se buscaron en el módulo "modelador de anticuerpos" de MOE. La estructura de rayos X 3L5X y 1 W72 se identificaron mediante MOE como las plantillas adecuadas para construir los modelos de homología para scFv06475 y scFv08168, respectivamente. Los modelos de homología luego fueron construidos por MOE, usando el campo de fuerza CHARMM27 para minimizar la energía.

Los modelos producidos por MOE estaban sujetos a cinco etapas de minimización de energía y simulación MD en NAMD. Los modelos completos fueron minimizados en energía para 5000 pasos en la primera a la tercera etapa, y con restricciones de 30 kcal/mol/Å² aplicado en diferentes conjuntos de átomos. En la primera etapa, las restricciones se aplicaron a todos los átomos, pero los átomos de la cadena lateral en CDR. En la segunda etapa, las restricciones se aplicaron a todos los átomos, pero los residuos en CDR. En la tercera etapa, las restricciones se

aplicaron solo a los átomos de la red troncal. Los modelos fueron luego simulados al vacío por 100 ps en 50 K en la cuarta etapa, con restricciones de 30 kcal/mol/Å² aplicado en los átomos de la red troncal. En la última y quinta etapa, los modelos fueron minimizados en energía para 5000 pasos con restricciones de 30 kcal/mol/Å² aplicado en los átomos de la red troncal. Los modelos después de estas cinco etapas de minimización y simulación MD se tomaron como los modelos de homología para el diseño de mutación basada en la estructura.

Los modelos mutantes se construyeron sobre los modelos de homología de tipo salvaje. El comando "mutar" del módulo "psfgen" de VMD se usó para mutar residuos a los aminoácidos diseñados (William Humphrey y col., (1996) J. Molecular Graphics, 14: 33-38) Los modelos mutados fueron luego minimizados y simulados en seis etapas. Se realizaron 5000 pasos de minimización de energía en la primera a la cuarta etapa. Restricciones de 30 kcal/mol/Å² se aplicaron en todos los átomos, pero la cadena lateral del residuo mutado en la primera etapa. Se aplicaron restricciones de la misma fuerza sobre todos los átomos pero el residuo mutado en la segunda etapa. Las restricciones sobre los átomos de la cadena lateral de los residuos a 5 Å del residuo mutado se eliminaron en la tercera etapa. Las restricciones sobre los átomos de la cadena principal de los residuos a 5 Å del residuo mutado también se liberaron en la cuarta etapa. Con las mismas restricciones que las de la cuarta etapa aplicada, los modelos mutados fueron simulados al vacío por 100 ps a 50K. Las últimas instantáneas de las trayectorias de simulación se redujeron luego a la energía de nuevo para 5000 pasos, con las mismas restricciones que las de la cuarta etapa. Estos modelos minimizados se tomaron como los modelos de homología de los mutantes.

Construcción, expresión y purificación de bibliotecas basadas en placas en el sistema de E. coli

La mutagénesis de alto rendimiento se realizó usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange XL (Stratagene). Los cebadores se diseñaron de acuerdo con el software de diseño de cebadores Mutaprimer y se ordenaron a IDT en un formato de 96 pocillos con concentraciones normalizadas. El volumen de la reacción de síntesis de cadena mutante se redujo de 50 a 25 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en la placa de PCR de 96 pocillos. Después del ciclo, se añadieron 0,5 µl de enzima DpnI a cada reacción de amplificación y se incubaron a 37 °C durante 2 h para digerir el ADNds parental. La transformación se realizó añadiendo 2 µl de reacción de mutagénesis digerida con DpnI en 20 µl de células competentes de Acella química en una placa PCR de 96 pocillos.

Se recogieron tres colonias individuales de cada placa de transformación para expresión y purificación. La expresión se realizó en dos placas de 96 pozos profundos utilizando medios de autoinducción. Se guardaron alícuotas de cultivo bacteriano como reservas de glicerol y se enviaron para análisis de secuenciación. El pellet bacteriano combinado de las dos placas para cada colonia individual se lisó y se purificó con el sistema de purificación de proteínas MagneHis de Promega. El instrumento KingFisher se configuró para una purificación de alto rendimiento. Se añadió NaCl 1 M a la lisis y al tampón de lavado para mejorar la pureza de la proteína. La proteína se eluyó con 100 µl de imidazol 300 mM en PBS. La cantidad de proteína se verificó brevemente con Coomassie plus (Thermo) con el fin de determinar la cantidad óptima de proteína para la Fluorimetría de Barrido Diferencial (DSF).

Cribado de mutaciones termoestables por DSF y Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Dependiendo de la cantidad de proteína purificada para cada muestra, usualmente se usaron de 10 a 20 µl de elución para el análisis de DSF. Específicamente, se mezclaron muestras de 10-20 µl con Sypro Orange (Invitrogen) de una dilución final a 1: 1000, en un volumen total de 25 µl en PBS. Las muestras fueron procesadas por BioRad CFX1000 (25 °C durante 2 minutos, luego incrementó 0.5 °C durante 30 segundos, de 25 a 95 °C). Los éxitos se definieron como T_m por encima de 2C por encima de scFv de tipo salvaje. La actividad de unión a scFv se determinó mediante ELISA de un punto.

Producción de proteínas en células de mamíferos

Se introdujeron mutaciones en la construcción de mamífero pRS5a que tiene scFv06475 o scFv08168 con etiqueta His. Las construcciones se expresaron transitoriamente en 50 ml de células en suspensión 293T. Brevemente, se mezcló PEI con 50 µg de ADN a 1: 3 para una eficacia de transfección óptima. Las células a 1,4 e6 por ml se usaron para la transfección. Las células transfectadas se recolectaron después de seis días de incubación en CO₂ cámara de 80 rpm agitando en un matraz de papel de filtro de 250 ml. El sobrenadante se concentró a alrededor de 1 ml para una recuperación proteica óptima. La proteína se purifica manualmente mediante el kit MagneHis de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína purificada se dializó en PBS durante la noche con cambio de tampones. Se usaron muestras de proteína antes o después de la diálisis para el análisis DSF.

Medida de afinidad para scFv

La CE₅₀ de unión de scFv frente a la proteína LRP6 se midió mediante ELISA. La placa Maxisorp se revistió con LRP6-Fc (R & D Sysytems, catálogo N°: 1505-LR) a 3 µg/ml a 4 °C durante la noche. La placa se bloqueó con 50 µl de BSA al 2 % durante una hora y se lavó cinco veces con la solución de lavado. Las muestras se diluyeron con BSA al 1 % en consecuencia. La placa se incubó a TA durante 1 hora y se lavó 3 veces. La detección se realizó mediante la adición de 50 µl de pentaHis-HRP (Qiagen Mat. No. 1014992) a una dilución 1: 2000 en BSA al 1 %, se incubó a TA durante 1 hora y se lavó 3 veces. Se añadieron 50 µl de reactivo sustrato A más B (sistemas de R & D),

luego se incubaron durante 5-20 minutos dependiendo del color. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl de la solución de detención, seguido de la lectura de la placa a 450 nm.

Los experimentos de cinética se realizaron utilizando el biosensor Proteon XPR36 de BioRad. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente usando PBST (solución salina tamponada con fosfato con 0,05 % de Tween-20) como tampón de ejecución. Todos los seis canales verticales en un chip GLM se activaron durante 5 minutos a un caudal de 30 µl/min usando una mezcla recién preparada de EDC (400 mM) y sNHS (100 mM). Anti-His IgG1 de ratón (sistemas R & D, catálogo No: MAB050) se diluyó a 20 µg/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 5,0 y se acopló al chip durante 5 min a lo largo de canales verticales separados a un caudal de 30 µl/min. A continuación, se inyectó 1 M de etanolamina durante 5 minutos a 30 µl/min para desactivar los grupos de sNHS no reaccionados. A continuación, se inmovilizaron 2 µg/ml de ScFv MOR08168 de tipo salvaje o 2 µg/ml de MOR08168 D1 mutante en diferentes canales verticales durante 15 segundos a 100 µl/min seguido de dos inyecciones de 1 minuto del tampón de ejecución a 30 µl/min en dirección horizontal. El sexto canal vertical se utilizó como referencia de canal y no se inmovilizó ligando en este canal. Se preparó una serie de dilución de un antígeno homodímero de 360 KD LRP6-Fc (sistemas de I + D, catálogo N°: 1505-LR) a concentraciones finales de 300, 100, 33, 11 y 3,7 nM e inyectada a 30 µl/min a lo largo de cada horizontal canal. La asociación se controló durante 5 minutos y la disociación se controló durante 20 minutos. Se inyectó buffer en el sexto canal para que sirva como referencia de fila para la corrección de deriva de línea base en tiempo real. La superficie del chip se regeneró aplicando ácido fosfórico al 0,85 % a 100 µl/min durante 18 s en la dirección horizontal, seguido de la misma condición de funcionamiento en la dirección vertical.

El análisis cinético del Proteon se realizó en Proteon Manager v.2.1.1. Cada dato de punto de interacción fue restado por una referencia de canal seguida por una referencia de fila para corregir el desplazamiento de referencia en tiempo real. Los datos procesados se ajustaron globalmente a un modelo de analito bivalente.

Resultados

La mutagénesis, expresión y purificación en placas en E. coli permitió un cribado más eficiente de las bibliotecas centradas

Con el fin de lograr un alto rendimiento para facilitar el análisis en sentido descendente, se probó el efecto de la secuencia líder en la expresión. Se demostró que el líder con pelB arrojó la mayor cantidad de proteína purificada entre los siete líderes analizados, como se muestra en la figura 28A. Varias cepas bacterianas, incluyendo BL21 (DE3), XL-1 Blue y W3110 se probaron para la expresión con inducción de IPTG. El nivel de expresión de scFv06475 en BL21 (DE3) fue mayor que en XL-1 azul y ligeramente más alto que en W3110, como se muestra en la figura 28B. Con el fin de facilitar la clonación, transformación y expresión de mutagénesis, se utilizó Acella (un derivado de BL21) para todos los experimentos posteriores, ya que la clonación y la expresión se pueden realizar en la misma cepa con alta eficacia. La proteína se purificó del lisado celular mediante KingFisher usando el kit MagneHis. El rendimiento estimado para scFv08168 fue de alrededor de 10 µg por muestra de pozos combinados de placas de cultivo de pozos profundos, de los cuales 2 µg se usaron para el análisis de termoestabilidad de DSF. El cribado de HTP basado en placa ha acortado el tiempo significativamente a alrededor de una semana desde imprimadores hasta golpes con termoestabilidad mejorada.

Mejora de la termoestabilidad de scFv por mutación de punto único de bibliotecas enfocadas

Se definió como una mejora para la termoestabilidad mejorada la mejora de la T_m al menos 1 °C por encima del tipo salvaje de manera consistente. Hubo 9 aciertos de un total de 51 variantes confirmadas por secuencia para scFv06475 y 15 aciertos de un total de 83 variantes confirmadas por secuencia para scFv08168. Los éxitos seleccionados se muestran en la Fig. 28 para scFv06475 y la Fig. 29 para scFv08168.

Se usaron dos enfoques para la selección de mutaciones puntuales para estabilizar scFv06475 y scFv08168: análisis de consenso de secuencia y diseño de mutación basado en estructura. Entre las 250 secuencias superiores homólogas al dominio VH de scFv06475, la posición VH: 34 estaba ocupada comúnmente por Met (45 %) o Val (48 %) (todo el sistema de numeración en el texto es del sistema de Kabat). Sin embargo, esta posición era un residuo de Gly en la secuencia de tipo salvaje de scFv06475. Dos mutantes, VH: G34M y VH: G34V, se diseñaron para mutar el aminoácido natural a los aminoácidos más populares en esta posición. Como se enumera en la Fig. 28, el mutante VH: G34V mostró consistentemente una mayor estabilidad que el scFv06475 de tipo salvaje cuando se expresó y purificó mediante dos protocolos diferentes. El mutante VH: G34M no se expresó bien en bacterias, probablemente debido a una secuencia incorrecta causada por errores en el procedimiento de PCR.

Con base en el mismo análisis de consenso de secuencia, las mutaciones de VH: I34M, VH: G50S, VH: W52aG y VH: H58Y se diseñaron para mutar los residuos en scFv08168 a los aminoácidos de consenso en sus 250 secuencias homólogas superiores. Como se muestra en la Fig. 30, estas mutaciones mejoraron la T_m de scFv08168 en 7,5 °C, 3,0 °C, 7,0 °C y 3,5 °C, respectivamente.

En el enfoque basado en la estructura, un modelo de homología de scFv06475 y un modelo de homología de

scFv08168 se construyeron primero con MOE y luego se minimizó la energía con NAMD. Estos modelos fueron luego inspeccionados visualmente en busca de posibles mutaciones para mejorar la interacción local. Se diseñaron mutaciones en varios residuos de scFv06475 y scFv08168, basadas en cinco interpretaciones biofísicas de la estabilidad de la proteína.

El primer enfoque fue aumentar el tamaño de las cadenas laterales en el núcleo de proteína para mejorar el empaque. Unos pocos residuos hidrófobos con cadenas laterales enfrentadas al núcleo de proteína se mutaron a cadenas laterales más grandes para mejorar el empaquetamiento alrededor de estos residuos. Después del cribado, se encontraron tres mutaciones diseñadas mediante este enfoque para mejorar la estabilidad de scFv08168. Como se enumera en la Fig. 30, las mutaciones VH: I34F, VL: V47L y VL: G64V mejoraron la temperatura de fusión del scFv08168 en 4.0 °C, 2.5 °C y 2.0 °C, respectivamente.

El segundo enfoque fue mutar los residuos hidrófobos en residuos aromáticos para formar la interacción de apilamiento pi-pi. En el modelo de homología scFv06475 de tipo salvaje, como se muestra en la figura 33a, la cadena lateral del residuo VH: I37 estaba muy cerca de dos residuos aromáticos de VH: W103 y VL: F98. La distancia más próxima entre cualquier átomo de cadena lateral que no sea hidrógeno de VH: I37 y cualquier átomo de cadena lateral no de hidrógeno de VH: W103 fue 3.82Å. La distancia de contraparte entre VH: I37 y VL: F98 fue de 3.77Å. Como se muestra en la figura 33b, se formaron dos interacciones de apilamiento pi-pi perpendiculares cuando se introdujo un residuo de Phe a esta región local a través de la mutación VH: I37F: una entre VH: F37 y VH: W103, y la otra entre VH: F37 y VL: F98. La interacción de apilamiento de pi-pi recién formada debe ser más fuerte que la interacción hidrofóbica original en esta región localizada, ya que la temperatura de fusión de scFv06475 se mejoró por esta mutación de 61 a 64.5°C (figura 28). La mutación VH: M95F también mejoró la estabilidad de scFv06475 formando interacción de apilamiento de pi-pi con VH: W50 y VH: F100 (figura 29). La T_m se mejoró de 61 a 64.5 °C.

El tercer enfoque fue mutar residuos no cargados a residuos cargados para formar puentes de sal. El residuo VH: K43 de scFv06475 no formó un puente de sal con residuos vecinos en el modelo de homología. Dado que la cadena lateral VH: V85 encarada directamente a VH: K43 en el modelo de homología de scFv06475 (figura 33e), se mutó a carga negativa para formar un puente de sal con VH: K43. Como se muestra en la figura 33f, la distancia entre los átomos no hidrógeno de la cadena lateral VH: E85 mutada y los átomos no hidrógeno de la cadena lateral VH: K43 podría ser tan corta como 2,61 Å, lo que sugiere que podría establecerse un puente salino entre los dos residuos. La estabilidad mejorada de scFv06475 sobre la mutación VH: V85E enumerada en la figura 29 de hecho respaldaba la lógica de diseño en esta posición.

El cuarto enfoque fue mutar los residuos hidrofóbicos en residuos polares para establecer enlaces de hidrógeno. Como se ilustra en la Fig. 33c, el residuo VH: V33 hidrófobo estaba cerca de un residuo polar VH: N100a en el modelo de homología de scFv08168. Cuando se inserta un residuo polar en esta región a través de la mutación VH: V33N, se puede formar un enlace de hidrógeno adicional entre VH: N33 y VH: N100a. El modelado de homología sugirió que la distancia entre el átomo ND2 de VH: N33 y uno de los átomos OD de VH: N100a podría ser tan corta como 2.80 Å, que estaba dentro del rango de un enlace de hidrógeno, como se muestra en la figura 33d. Como se muestra en la Fig. 29, esta mutación VH: V33N mejoró la estabilidad de scFv08168 en 2.0 °C. Del mismo modo, la mejora de la estabilidad de la mutación VL: D93N en scFv06475 (véase la Fig. 29) podría atribuirse a la geometría de enlace de hidrógeno mejorada con VL: Q27 y VL: Q90.

Basándose en la observación sorprendente en el modelo de homología de scFv08168 de que dos residuos polares de VL: T78 y VH: S49 estaban rodeados de cadenas laterales puramente hidrófobas, el quinto enfoque se utilizó para mutar los dos residuos polares en el entorno de otra manera hidrofóbica a no residuos polares. Dos residuos polares de VL: T78 y VH: S49 estaban rodeados por cadenas laterales puramente hidrofóbicas. Como se enumera en la Fig. 29, las mutaciones VL: T78V y VH: S49A aumentaron la temperatura de fusión de scFv08168 en 2.5 °C y 5.5 °C, respectivamente.

Se realizó un ELISA de un punto para evaluar la actividad de unión. Ciertos impactos se eliminaron debido a la reducción o pérdida de la actividad vinculante hacia LRP6. Por ejemplo, la mutación VH: W052aG de scFv08168 mejoró T_m en 7 °C, pero mostró una actividad de unión mucho más reducida en comparación con scFv08168 de tipo salvaje. Por lo tanto, no fue seleccionado para un análisis posterior.

La presencia de imidazol 300 mM en el tampón de elución a veces causaba un cambio global de T_m por DSF, como se observó en scFv06475. Pero el efecto no afectó el ranking de T_m. También hubo diferencia en la proteína producida en E. coli frente a las células de mamífero para scFv06475, como se muestra en la Fig. 28. Por el contrario, la presencia de imidazol tiene un efecto mínimo sobre la T_m de scFv08168, como se muestra en la Fig. 30 y Fig. 31. Además, el valor de T_m permaneció sin cambios para la proteína producida a partir de E. coli o de mamíferos para scFv08168, como se muestra en la Fig. 31. Tanto si hubo un cambio en T_m como si no, la clasificación de T_m permaneció igual.

Para confirmar el efecto de la termoestabilidad en proteínas producidas en células de mamífero, estas mutaciones se introdujeron en la construcción para el vector de expresión de mamífero y se expresaron en células en

suspensión 293T. Fueron purificados por cuentas de MagneHis. Se verificó la T_m y se confirmaron las coincidencias para una termoestabilidad mejorada en las proteínas expresadas en células de mamíferos como se muestra en la Fig. 31 para scFv08168. La mutación de punto único con la mejora más alta de termoestabilidad para scFv08168 es VH: I34M con una mejora de 7,5 °C.

Combinación de mutaciones para mejorar aún más la termoestabilidad

Para mejorar aún más la termoestabilidad, las mutaciones únicas que mejoraron la termoestabilidad del scFv se combinaron para producir mutaciones dobles en scFv08168. Como se muestra en la Fig. 31, los efectos aditivos se observaron para la mayoría de los mutantes dobles, incluido D1, que mostró una mejora de 12,5 °C mediante la combinación de dos mutaciones de VH: I34M y VH: S49A, mientras que la única mutación se dirigió a 7.5 y aumento de 5,5 °C en T_m , respectivamente.

Los mutantes termoestables se caracterizan por la unión y la actividad funcional

Análisis de afinidad ELISA CE_{50} se llevó a cabo para el tipo salvaje scFv08168 y scFv06475 y variantes. Como se muestra en la Fig. 32, para scFv08168, los aciertos mostraron CE comparables en su mayoría₅₀ como scFv08168 de tipo salvaje, con algunos mutantes parece ser un poco más activo que el tipo salvaje, incluido el doble mutante D1. Esto se confirmó con la medición de afinidad de Proteon y la actividad de ensayo basada en células STF (realizada como se ha descrito anteriormente en esta solicitud (Materiales y Procedimientos, sección 8), como se muestra en la Fig. 32. Las clasificaciones de afinidad por Octet de scFv08168 mostraron que eran comparables a tipo salvaje (datos no mostrados), en el análisis de cinética de Proteon, KD de D1 fue de 2,55 nM, mientras que KD de tipo salvaje fue de 3,82 nM (Fig. 32).

Para scFv06475, hubo dos mutaciones que afectan a la actividad detectada por ELISA y análisis de cinética de Proteon. Específicamente, en ELISA, VH: G34V y VH: I37F mostró CE_{50} para ser 27 nM y 4,3 nM, respectivamente, en comparación con el tipo salvaje de 0,76 nM. En el análisis de Proteon, VH: G34V y VH: I39F mostraron una caída significativa en la velocidad de desconexión (datos no mostrados).

Mejora de la termoestabilidad de las moléculas biparatópicas

Para las moléculas de fusión basadas en IgG 902 y la versión mutante 902T, el primer pico de T_m se desplazó de 47 °C a 62 °C. Este pico corresponde al despliegue de scFv08168. El segundo pico cambió de 72 °C a 76 °C. Este pico corresponde a Fab06475, como se muestra en la Fig. 34.

Discusión

El diseño racional basado en el análisis de secuencias y el modelado de homología ha producido mutaciones termoestables para scFv. En los ejemplos actuales, la tasa de aciertos fue de alrededor del 18 % tanto para scFv08168 como para scFv06475. La mejora más significativa fue un aumento de 7,5 °C en T_m sobre el tipo salvaje mediante una única mutación puntual VH: I34M en scFv08168. En la perspectiva de la secuencia, esta posición se conservó altamente para Met. Estructuralmente, una cadena lateral hidrofóbica más grande en esta posición podría mejorar el empaque alrededor de este residuo. Otra mutación puntual VH: S49A en la variante scFv08168 aumentó la T_m en 5 °C. Esta mutación fue seleccionada por modelado de homología. Aunque esta posición es más conservada para Ser que para Ala, estructuralmente Ala puede caber mejor debido a la falta de cadena lateral polar alrededor de este residuo.

Para el diseño de mutación basada en la estructura que usa el modelado de homología, se utilizó una combinación de mecanismos. En scFv06475 y scFv08168, se descubrieron impactos positivos por cada una de las cinco consideraciones biofísicas: mejora del empaquetamiento, más apilamiento Pi-Pi, más enlaces de hidrógeno, más puentes salinos y eliminación de grupos polares enterrados. Fue por esta combinación de mecanismos que se identificaron un total de 10 mutaciones estabilizadoras, como se enumera en la Fig. 29 y 30.

La combinación de mutaciones identificadas para mejorar la estabilidad térmica ("mutaciones beneficiosas") mejora aún más la termoestabilidad si estuvieran ubicadas en diferentes áreas. Esto se demostró en el caso de scFv08168. Cuando se combinaron la mutación beneficiosa VH: I34M y VH: S49A, la T_m se aumentó adicionalmente a 62,5 °C frente a la de tipo salvaje a 49 °C. Esto fue un aumento de 13.5 °C sobre el tipo salvaje, donde la mutación individual VH I34M y VH: S49A elevaron cada una T_m en 7.5 °C y 5 °C respectivamente. Esta fue una indicación clara para el efecto aditivo.

I34M estaba muy cerca de CDR1-H de scFv08168, sin embargo, la mutación no afectó la afinidad de unión como se evidencia por una serie de ensayos. La CDR juega un papel en el scFv global o en la estabilidad total del anticuerpo. Se puede lograr una mejora significativa mediante la ingeniería de residuos cerca de la región CDR usando los procedimientos descritos, siempre que la mutación no afecte a la afinidad y especificidad de unión.

La mayoría de las mutaciones estabilizadoras se han localizado en VH. De las 15 mutaciones estabilizadoras

enumeradas en las Fig. 29 y 30, 11 fueron mutaciones en el dominio VH mientras que solo 4 estaban en el dominio VL.

Cuando se incorporaron a IgG u otros formatos (por ejemplo, fusiones de albúmina sérica), la VH y VL estabilizadas condujeron a una mejora espectacular en la termoestabilidad de las moléculas. Para la fusión de IgG, la T_m inferior de 47°C corresponde a la T_m de scFv08168, mientras que el pico más alto a 72,5°C corresponde a la T_m de CH2 y Fab06475. La incorporación de dos mutaciones VH: I34M y VH: S49A ha mejorado la T_m de scFv08168 de 47 °C a 62 °C, mientras que la incorporación de VH: M95F en 6475 mejoró la T_m de Fab de 72.5 °C a 76 °C. La mejora no solo se mostró en scFv en sí, sino también en Fab debido a la estabilidad mejorada de VH y VL. Esto puede proporcionar una estrategia más general para mejorar la estabilidad general del anticuerpo.

El diseño racional junto con el cribado de HTP en el sistema de E. coli ha ofrecido un tiempo de respuesta muy rápido y una alta tasa de aciertos. La T_m medida con materiales de E. coli se correlacionaba con la de mamíferos, o la clasificación seguía siendo la misma. Este proceso de cribado muy simplificado se implementó como HTP en E. coli. La mutagénesis, la transformación, la expresión y la purificación basadas en placas redujeron el tiempo a menos de una semana. Usando los procedimientos descritos en el presente documento, se pueden realizar varias mutaciones en scFv u otros fragmentos de unión a antígeno y seleccionarse para la estabilidad térmica. Estos scFv mutados o fragmentos de unión a antígeno se pueden usar luego como componentes de constructos de anticuerpos más grandes tales como anticuerpos biparatópicos, para conferir dicha estabilidad a la construcción de anticuerpo más grande.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Ettenberg, Seth Alexander
 Cong, Feng
 Hartlepp, Felix

10 Klagge, Ingo Markus

<120> Composiciones y procedimientos de uso para anticuerpos de proteína 6 relacionados con lipoproteínas de baja densidad (LRP6) terapéuticos

15 <130> PAT054171-WO-PCT
 <150> 61/331985

<151> 2010-05-06

20 <160> 208
 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

25 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT

30 <213> Homo Sapien
 <400> 1

35 **Asp Tyr Val Ile Asn**
 1 5
 <210> 2
 <211> 17

40 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <400> 2

Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

50 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT

55 <213> Homo Sapien
 <400> 3

Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp Val
 1 5 10 15

60 <210> 4

<211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Homo Sapien
 <400> 4
 Ser Gly Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Tyr
 1 5 10
 10 <210> 5
 <211> 6
 15 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <400> 5
 20 Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 6
 25 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 30 <400> 6
 Gln Ser Tyr Asp Gly Gln Lys Ser Leu Val
 1 5 10
 35 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Homo Sapien
 <400> 7
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 1 5
 45 <210> 8
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 55 <400> 8
 Ser Trp Ser Gly Val Asn
 1 5
 60 <210> 9
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Homo Sapien
 5 <400> 9
 Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp Val
 1 5 10 15
 10 <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Homo Sapien
 <400> 10
 Asp Ser Leu Arg Asn Lys
 20 1 5
 <210> 11
 <211> 2
 25 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 30 <400> 11
 Lys Asn
 1
 <210> 12
 35 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Homo Sapien
 <400> 12
 Tyr Asp Gly Gln Lys Ser Leu
 1 5
 45 <210> 13
 <211> 105
 50 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <400> 13
 55

ES 2 659 406 T3

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

<210> 14

5 <211> 124

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10 <400> 14

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

15 <210> 15

<211> 315

<212> ADN

20 <213> Homo Sapien

<400> 15

gatatacgaac tgaccacagcc gccttcagtg agcgttgcac caggtcagac cgcgcgtatc 60
 tcgtgtagcg gcgattctct tcgtaataag gtttattggt accagcagaa acccgggcag 120
 gcgccagttc ttgtgattta taagaataat cgtccctcag gcatcccgga acgcttttagc 180
 ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa 240
 gcggtattatt attgccagtc ttatgatggt cagaagtctc ttgtgttttg cggcggcacg 300
 aagttaaccg tccta 315

<210> 16

<211> 372

30 <212> ADN

<213> Homo Sapien

35 <400> 16

ES 2 659 406 T3

```

cagggtgcaat tgggtggaaag cggcgggcggc ctggtgcaac cggcgggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct gattatgtta ttaattgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggg atttcttggt ctggtgttaa tactcattat 180
gctgattctg ttaagggctg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggcctgtg attattgcgc gcgtcttggt 300
gctactgcta ataattattcg ttataagttt atggatgttt ggggccaagg caccctggtg 360
acggttagct ca 372

```

<210> 17

5 <211> 211

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 17

```

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

```

15 <210> 18

<211> 454

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 18

25 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 659 406 T3

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

<210> 19

5 <211> 633

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 19

ES 2 659 406 T3

```

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
tcgtgtagcg gcgattctct tcgtaataag gtttattggt accagcagaa acccgggcag 120
gcgccagttc ttgtgattta taagaataat cgtccctcag gcatcccgga acgctttagc 180
ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa 240
gcggattatt attgccagtc ttatgatggt cagaagtctc ttgtgtttgg cggcggcacg 300
aagttaaccg tccttaggtca gcccaaggct gcccctcgg tcaactctgtt cccgccctcc 360
tctgaggagc ttcaagccaa caaggccaca ctggtgtgtc tcataagtga cttctaccgc 420
ggagccgtga cagtggcctg gaaggcagat agcagcccg tcaaggcggg agtggagacc 480
accacaccct ccaaacaaag caacaacaag tacgcggcca gcagctatct gagcctgacg 540
cctgagcagt ggaagtcca cagaagctac agctgccagg tcacgcatga agggagcacc 600
gtggagaaga cagtggcccc tacagaatgt tca 633

```

<210> 20

5 <211> 1362

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 20

```

caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcgag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct gattatgtta ttaattgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggg atttcttggg ctggtgttaa tactcattat 180
gctgattctg ttaagggtcg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tcgggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtcttggg 300
gctactgcta ataatttcg ttataagttt atggatgttt ggggccaagg caccctgggtg 360
acggttagct cagcctccac caagggtcca tcggtcttcc ccctggcacc ctccctccaa 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgccctggtc aggactactt cccgaaccg 480
gtgacgggtg cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggtgtc 540
ctacagtctc caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
agagttgagc ccaaattcttgc tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 720
gcagcggggg gaccgtcagt cttcctcttc ccccctcttc ccaaggacac cctcatgatc 780
tcccggagcc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 840
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900
gagcagtgaca acagcacgta ccgggtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 960
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1020
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080
tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggtctctat 1140
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200
acgctctccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctctc acagcaagct caccgtggac 1260
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1362

```

15 <210> 21

<211> 5

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 21

Val Asn Gly Met His

25

1

5

<210> 22

<211> 16

30

<212> PRT

<213> Homo Sapien

35

<400> 22

ES 2 659 406 T3

	Val	Ile	Asp	Gly	Met	Gly	His	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly
	1				5					10					15	

<210> 23

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10 <400> 23

	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ala	Phe	Asp	Pro
	1				5					10	

15 <210> 24

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Homo Sapien

<400> 24

	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Tyr	Val	His
	1				5					10	

25 <210> 25

<211> 7

30 <212> PRT

<213> Homo Sapien

35 <400> 25

	Gly	Asp	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser
	1				5		

40 <210> 26

<211> 10

<212> PRT

45 <213> Homo Sapien

<400> 26

	Thr	Arg	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Ser	Gly	Val
	1				5					10

50 <210> 27

<211> 7

55 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 27

60

	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Val	Asn
	1				5		

<210> 28
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 10 <400> 28
 Asp Gly Met Gly His
 1 5
 <210> 29
 15 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Homo Sapien
 <400> 29
 Tyr Asp Tyr Ile Lys Tyr Gly Ala Phe Asp Pro
 1 5 10
 25 <210> 30
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <400> 30
 35 Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr
 1 5
 <210> 31
 40 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 45 <400> 31
 Gly Asp Ser
 1
 50 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 55 <213> Homo Sapien
 <400> 32
 Thr Ser Thr Pro Ile Ser Gly
 60 1 5

<210> 33

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 33

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

<210> 34

15 <211> 119

<212> PRT

<213> Homo Sapien

20

<400> 34

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

25

<210> 35

<211> 107

30

<212> PRT

<213> Homo Sapien

35 <400> 35

ES 2 659 406 T3

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

<210> 36

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 36

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

15 <210> 37

<211> 321

<212> ADN

20

<213> Homo Sapien

<400> 37

gatatacgaac tgacccagcc gccttcagtg agcggttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
 tcgtgtagcg gcgataatat tggttctaag tatgttcatt ggtaccagca gaaacccggg 120
 caggcgccag ttcttgatgat ttatggtgat tctaatacgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
 ttttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg cactcgtact tctactccta tttctggtgt gtttggcggc 300
 25 ggcacgaagt taaccgttct t 321

<210> 38

<211> 357

30

<212> ADN

<213> Homo Sapien

35 <400> 38

ES 2 659 406 T3

```
cagggtgcaat tgggtggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct gttaatggta tgcattgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attgatggta tgggtcatac ttattatgct 180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg ttatgattat 300
attaagtatg gtgcttttga tccttggggc caaggcacc cgggtgacggt tagctca 357
```

<210> 39

5 <211> 212

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 39

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

15 <210> 40

<211> 221

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 40

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Asn
```

ES 2 659 406 T3

			20					25					30			
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Val	Ile	Asp	Gly	Met	Gly	His	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	
	50					55					60					
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	
65					70					75					80	
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				85					90					95		
Arg	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ala	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
		115					120					125				
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
	130					135					140					
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
145					150					155					160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
				165					170					175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
			180					185					190			
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
		195					200					205				
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser				
	210					215					220					

<210> 41

5 <211> 636

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 41

gatatcgaac	tgacccagcc	gccttcagt	agcgttgca	caggtcagac	cgcgcgatc	60
tcgtgtagcg	gcgataatat	tggttctaag	tatgttcatt	ggtaccagca	gaaacccggg	120
caggcgccag	ttcttgtgat	ttatggtgat	tctaatoctc	cctcaggcat	cccggaacgc	180
tttagcggat	ccaacagcgg	caacaccgcg	accctgacca	ttatggcgac	tcaggcgga	240
gcgaagcgg	attattattc	cactcgtact	tctactocta	tcttgggtgt	gtttggcgcc	300
ggcacgaagt	taaccgttct	tggccagccg	aaagccgcac	cgagtgtgac	gctgtttccg	360
ccgagcagcg	aagaattgca	ggcgaaacaa	gcgaccctgg	tgtgcctgat	tagcgacttt	420
tatccgggag	ccgtgacagt	ggcctggaag	gcagatagca	gccccgtcaa	ggcgggagtg	480
gagaccacca	caccctccaa	acaaagcaac	aacaagtacg	cggccagcag	ctatctgagc	540
ctgacgcctg	agcagtgga	gtcccacaga	agctacagct	gccaggtcac	gcattgaggg	600
aqcaccctgg	aaaaaacctg	tgcgcgcact	gagccc			636

15 <210> 42

<211> 663

<212> ADN

20

<213> Homo Sapien

<400> 42

caggtgcaat	tggtggaag	cggcggcgc	ctggtgcaac	cggcggcgc	cctgcgtctg	60
agctgcgcg	cctccgatt	tacctttct	gttaatgga	tgcattggg	gcgccaagc	120
cctgggaag	gtctcgagt	ggtgagcgt	attgatgga	tgggtcatac	ttattatgct	180
gattctgtta	agggtcgtt	taccatttca	cgtgataatt	cgaaaaacac	cctgtatctg	240
caaatgaaca	gctgcgtgc	ggaagatac	gccgtgtatt	attgcgcgc	ttatgattat	300
attaagtatg	gtgcttttga	tccttggggc	caaggcacc	tgtgcagcgt	tagctcagcg	360
tcgaccaaag	gtccaagcgt	gtttccgctg	gctccgagca	gcaaaagcac	cagcggcggc	420
acggctgccc	tgggctgcct	ggttaaagat	tatttcccg	aaccagtcac	cgtgagctgg	480
aacagcggg	cgctgacca	cggcgtgcac	accttcccg	cgtgctgca	aagcagcgc	540
ctgtatagcc	tgagcagcgt	tgtgaccgtg	ccgagcagca	gcttaggcac	tcagacctat	600
atttgcaacg	tgaaccataa	accgagcaac	accaaagtgg	ataaaaaagt	ggaaccgaaa	660
aqc						663

25

<210> 43

<211> 107

5

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10 <400> 43

```

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

```

<210> 44

15

<211> 119

<212> PRT

20 <213> Homo Sapien

<400> 44

```

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

```

25

<210> 45

<211> 321

30 <212> ADN

<213> Homo Sapien

<400> 45

35

```

agctatgaac tgaccagcc gctgtctgtg agcgtggcgc tgggccagac cgcgcgtatt 60
acctgcggtg gcgataacat tggcagcaaa tatgtgcatt ggtatcagca gaaaccgggc 120
caggcgccgg tgctggtgat ttatggcgat agcaaccgtc cgagcgcat tccggaacgt 180
tttagcgcca gcaacagcgg caacaccgcg accctgacca tttctcgcgc gcaggcgggt 240
gatgaagcgg attattattg caccgtacc agcaccgccga ttagcggcgt gtttggcggc 300
ggtacgaagt taaccgttct t 321

```

<210> 46

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Homo Sapien

10 <400> 46

gaggtgcaat tgctggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cctccggatt taccttttct gttaatggta tgcattgggt gcgccaagcc 120

cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attgatggta tgggtcatac ttattatgct 180

gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240

caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg ttatgattat 300

attaagtatg gtgcttttga tccttggggc caaggcaccg tggtgacggt tagctca 357

15 <210> 47

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 47

25 Asp Tyr Ala Ile His

1 5

<210> 48

30 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

35 <400> 48

Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

40 <210> 49

<211> 14

<212> PRT

45 <213> Homo Sapien

<400> 49

Gly Ser His Gly Asn Ile Met Ala Lys Arg Tyr Phe Asp Phe

50 1 5 10

<210> 50

<211> 11

55 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 50

Ser Gly Asp Asn Ile Arg Lys Lys Tyr Val Tyr
1 5 10

5 <210> 51

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 51

15 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 52

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

25 <400> 52

Ser Thr Ala Asp Ser Gly Ile Asn Asn Gly Val

30 1 5 10

<210> 53

<211> 7

35 <212> PRT

<213> Homo Sapien

40 <400> 53

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 54

45 <211> 6

<212> PRT

50 <213> Homo Sapien

<400> 54

Ser Tyr Ser Gly Ser Ser
1 5

55 <210> 55

<211> 14

60 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 55
 Gly Ser His Gly Asn Ile Met Ala Lys Arg Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10
 5 <210> 56
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <400> 56
 15 Asp Asn Ile Arg Lys Lys Tyr
 1 5
 <210> 57
 20 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 25 <400> 57
 Glu Asp Ser
 1
 30 <210> 58
 <211> 8
 <212> PRT
 35 <213> Homo Sapien
 <400> 58
 Ala Asp Ser Gly Ile Asn Asn Gly
 1 5
 40 <210> 59
 <211> 108
 45 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 50 <400> 59

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

<210> 60

5 <211> 123

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 60

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

15 <210> 61

<211> 108

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 61

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

25

<210> 62

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo Sapien

5

<400> 62

```

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

```

10

<210> 63

<211> 324

<212> ADN

15

<213> Homo Sapien

<400> 63

```

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagt agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
tcgtgtagcg gcgataatat tcgtaagaag tatgtttatt ggtaccagca gaaacccggg 120
caggcgccag ttcttgtgat ttatgaggat tctaagcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
gacgaagcgg attattattg ctctactgct gattctggta ttaataatgg tgtgtttggc 300
ggcggcacga agttaaccgt tctt 324

```

20

<210> 64

<211> 369

25

<212> ADN

<213> Homo Sapien

30

<400> 64

```

caggtgcaat tggaggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcgag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct gattatgcta ttcatgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcggg atctcttatt ctggtagctc taccattat 180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggttct 300
catggttaata ttatggctaa gcgttatatt gatttttggg gccaaggcac cctggtgacg 360
gttagctca 369

```

<210> 65

35

<211> 214

<212> PRT

40

<213> Homo Sapien

<400> 65

ES 2 659 406 T3

```

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

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

```

5

<210> 66

<211> 453

10 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 66

15

20

25

30

35

40

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ser His Gly Asn Ile Met Ala Lys Arg Tyr Phe Asp Phe
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

5

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445
Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 67

10 <211> 642

<212> ADN

<213> Homo Sapien

15

<400> 67

```

gatatcgaac tgaccagacc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
tcgtgtagcg gcgataatat tcgtaagaag tatgtttatt ggtaccagca gaaacccggg 120
caggcgccag ttcttgtgat ttatgaggat tctaagcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
gacgaagcgg attattattg ctctactgct gattctggta ttaataatgg tgtgtttggc 300
ggcggcacga agttaaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcgggt cactctgttc 360
ccgcctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtc cataagtgc 420
ttctaccogg gagcctgac agtggcctgg aaggcagata gcagcccgt caaggcggga 480
gtggagacca ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcgccag cagctatctg 540
agcctgacgc ctgagcagtg gaagtccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 600
gggagcaccg tggagaagac agtggccct acagaatgtt ca 642

```

5 <210> 68

<211> 1359

<212> ADN

10

<213> Homo Sapien

<400> 68

```

cagggtgcaat tgggtgaaag cggcgggcggc ctggtgcaac cggcgggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct gattatgcta ttcattgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggg atctcttatt ctggtagctc taccattat 180
gcggtatagc tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggcctgtt attattgcgc gcgtggttct 300
catggttaata ttatggccaa gcgttatctt gatttttggg gccaaaggcac cctggtgacg 360
gttagctcag cctccaccaa ggttccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600
acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 660
gttagagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaagca 720
gcggggggac cgtcagctctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780
cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag 840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag 900
cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc gtccctaccg tcctgcacca ggactggctg 960
15 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1260
agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcagtaggc tctgcacaac 1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa 1359

```

<210> 69

20

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Homo Sapien

<400> 69

Asn Arg Gly Gly Gly Val Gly
1 5

30

<210> 70

<211> 16

35 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 70

Trp Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Thr
1 5 10 15

5 <210> 71

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 71

15 Met His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser
1 5

<210> 72

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo Sapien

25 <400> 72

Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

30 <210> 73

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Homo Sapien

<400> 73

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
40 1 5

<210> 74

<211> 9

45 <212> PRT

<213> Homo Sapien

50 <400> 74

Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Gln Thr
1 5

<210> 75

55 <211> 9

<212> PRT

60 <213> Homo Sapien

<400> 75
 Gly Phe Ser Leu Ser Asn Arg Gly Gly
 1 5
 5 <210> 76
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Homo Sapien
 <400> 76
 Asp Trp Asp Asp Asp
 15 1 5
 <210> 77
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 25 <400> 77
 Met His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser
 1 5
 <210> 78
 30 <211> 8
 <212> PRT
 35 <213> Homo Sapien
 <400> 78
 Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr
 1 5
 40 <210> 79
 <211> 3
 45 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <400> 79
 50 Gly Ala Ser
 1
 <210> 80
 55 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 60 <400> 80

ES 2 659 406 T3

Tyr Tyr Asp Tyr Pro Gln
1 5

<210> 81

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 81

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

15 <210> 82

<211> 119

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 82

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

25

<210> 83

<211> 324

30

<212> ADN

<213> Homo Sapien

35 <400> 83

gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcca acgtgcgacc 60
 ctgagctgca gagcgagcca gtttattggt tctcgttatc tggcttggtta ccagcagaaa 120
 ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggtgcttcta atcgtgcaac tgggggtccc 180
 gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
 cctgaagact ttgcgactta ttattgccag cagtattatg attatcctca gacctttggc 300
 cagggtacga aagttgaaat taaa 324

<210> 84

5 <211> 357

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10 <400> 84

caggtgcaat tgaagaaaag cggcccggcc ctggtgaaac cgacccaaac cctgaccctg 60
 acctgtacct ttcccgatt tagcctgtct aatcgtggtg gtggtgtggg ttggattcgc 120
 cagccgcctg ggaagccct cgagtggctg gcttggatcg attgggatga tgataagtct 180

tatagcacca gcctgaaaac gcgtctgacc attagcaaag atacttcgaa aaatcagggt 240
 gtgctgacta tgaccaacat ggacccggtg gatacggcca cctattattg cgcgcgatg 300
 catcttctc ttgtttttga ttcttggggc caaggcacc tggtgacggt tagctca 357

<210> 85

<211> 215

20 <212> PRT

<213> Homo Sapien

25 <400> 85

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Ser	Arg
		20						25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35						40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50				55						60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Pro
			85					90					95		
Gln	Thr	Phe	Gly	Gln	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> 86

30 <211> 449

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 86

5

```

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

145      150      155      160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165      170      175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180      185      190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195      200      205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210      215      220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225      230      235      240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245      250      255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260      265      270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275      280      285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290      295      300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305      310      315      320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325      330      335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340      345      350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355      360      365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370      375      380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385      390      395      400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405      410      415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420      425      430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435      440      445
Lys

```

10 <210> 87

<211> 645

<212> ADN

15

<213> Homo Sapien

<400> 87

```

gatatcgtgc tgacccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60
ctgagctgca gagcgagcca gtttattggt tctcgttatc tggcttggtg ccagcagaaa 120
ccagggtcaag caccgcgtct attaatattt ggtgcttcta atcgtgcaac tgggggtccc 180
gcgcgtttta gcggctcttg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
cctgaagact ttgcgactta ttattgccag cagtattatg attatcctca gacctttggc 300
cagggtagca aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatccagag aggccaaagt acagtggaa gttggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtgc tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
5 ggcctgagct cgcccgctcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

```

<210> 88

<211> 1347

10

<212> ADN

<213> Homo Sapien

15 <400> 88

```

caggtgcaat tgaagaaaag cggcccgcc ctggtgaaac cgacccaaac cctgaccctg 60
acctgtacct tttccggatt tagcctgtct aatcgtggtg gtgggtgtgg ttggattcgc 120
cagccgcctg ggaaagccct cgagtggctg gcttggatcg attgggatga tgataagtct 180
tatagcacca gcctgaaaac gcgtctgacc attagcaaag atacttcgaa aaatcaggtg 240
gtgctgacta tgaccaacat ggacccggtg gatacggcca cctattattg cgcgcgatg 300
catcttcctc ttgtttttga ttcttggggc caaggcaccc tgggtgacgt tagctcagcc 360
tccaccaagg gtccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttcccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gccagcaac accaaggtg acaagagagt tgagcccaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagcagc ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccg gaccctgag 780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccag actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

```

<210> 89

20

<211> 119

<212> PRT

25 <213> Homo Sapien

<400> 89

ES 2 659 406 T3

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

<210> 90

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 90

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

15

<210> 91

<211> 357

20

<212> ADN

<213> Homo Sapien

25

<400> 91

cagggtcacac tgaagagtc cggccctgcc ctggtcaaac ccaccagac cctgaccctg 60
 acatgcacct tcagcggctt cagcctgagc aacagaggcg gcggagtggg ctggatcaga 120
 cagcctcccg gcaaggccct ggaatggctg gcctggatcg actgggacga cgacaagagc 180
 tacagcacca gcctgaaaac cgggctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
 gtgctgacca tgaccaacat ggaccccggtg gacaccgcca cctactactg cgcccggatg 300
 catctgcccc tgggtgttcga tagctggggc cagggcaccc tggtcaccgt cagctca 357

<210> 92

30

<211> 324

<212> ADN

35

<213> Homo Sapien

<400> 92

ES 2 659 406 T3

```

gaaatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
ctgagctgcc gggccagcca gttcatcggc agcagatacc tggcttggtg tcagcagaag 120
cccgccaggg ccccgagact gctgatctac ggcggccagca accggggccac cggcatccct 180
gccagatttt ctggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggaa 240
cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagtactacg actaccccca gaccttcggc 300
cagggcacca agtggaat caag 324

```

<210> 93

5

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Homo Sapien

<400> 93

Asn Arg Gly Gly Gly Val Gly

1 5

15

<210> 94

<211> 16

20 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 94

25

Trp Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Thr

1 5 10 15

<210> 95

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

35

<400> 95

Met His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser

1 5

40 <210> 96

<211> 12

<212> PRT

45

<213> Homo Sapien

<400> 96

Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr Leu Ala

1 5 10

50

<210> 97

<211> 7

55

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 97
 Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 5 <210> 98
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <400> 98
 15 Gln Gln Tyr Trp Ser Ile Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 99
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 25 <400> 99
 Gly Phe Ser Leu Ser Asn Arg Gly Gly
 1 5
 30 <210> 100
 <211> 5
 <212> PRT
 35 <213> Homo Sapien
 <400> 100
 Asp Trp Asp Asp Asp
 40 1 5
 <210> 101
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 50 <400> 101
 Met His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser
 1 5
 <210> 102
 55 <211> 8
 <212> PRT
 60 <213> Homo Sapien

```

<400> 102
Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr
 1             5

5 <210> 103
<211> 3
<212> PRT
10 <213> Homo Sapien
<400> 103
Gly Ala Ser
15 1
<210> 104
<211> 6
20 <212> PRT
<213> Homo Sapien
25 <400> 104
Tyr Trp Ser Ile Pro Ile
 1             5

30 <210> 105
<211> 108
<212> PRT
35 <213> Homo Sapien
<400> 105
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1             5             10             15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg
 20             25             30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35             40             45
Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50             55             60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65             70             75             80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Ile Pro
 85             90             95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100             105

40 <210> 106
<211> 119
45 <212> PRT
<213> Homo Sapien
<400> 106
50

```

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

<210> 107

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 107

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

15 <210> 108

<211> 119

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 108

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

25

<210> 109

ES 2 659 406 T3

<211> 324

<212> ADN

5

<213> Homo Sapien

<400> 109

```

gatatcgtgc tgacccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcca acgtgacgacc 60
ctgagctgca gagcgagcca gtttattggt tctcgttatc tggcttggtg ccagcagaaa 120
ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggtgcttcta atcgtgcaac tggggtccc 180
gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gatatttacc tgaccattag cagcctggaa 240
cctgaagact ttgcggtgta ttattgccag cagtattggt ctattcctat tacctttggc 300
10 cagggtacga aagttgaaat taaa 324

```

<210> 110

<211> 357

15

<212> ADN

<213> Homo Sapien

20 <400> 110

```

cagggtgcaat tgaaagaaaag cggcccggcc ctggtgaaac cgacccaaac cctgaccctg 60
acctgtacct tttccggatt tagcctgtct aatcgtggtg gtggtgtggg ttggattcgc 120
cagccgcctg ggaaagccct cgagtggctg gcttggatcg attgggatga tgataagtct 180
tatagcacca gcctgaaaac gcgtctgacc attagcaaag atacttcgaa aaatcagggtg 240
gtgctgacta tgaccaacat ggacccgggtg gatacggcca cctattattg cgcgcgtatg 300
catcttcctc ttgtttttga ttcttggggc caaggcaccg tggtgacggt tagctca 357

```

<210> 111

25

<211> 215

<212> PRT

30 <213> Homo Sapien

<400> 111

ES 2 659 406 T3

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg
      20           25           30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
      35           40           45
Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
      50           55           60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
      65           70           75           80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Ile Pro
      85           90           95
Ile Thr Phe Gly Gln 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 Ala
      210          215

```

<210> 112

5 <211> 221

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 112

```

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
      115          120          125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
      130          135          140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
      145          150          155          160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
      165          170          175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
      180          185          190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
      195          200          205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
      210          215          220

```

15

<210> 113

<211> 645

<212> ADN

5 <213> Homo Sapien

<400> 113

```

gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcca acgtgcgacc 60
ctgagctgca gagcgagcca gtttattggt tctcgttatc tggcttggtg ccagcagaaa 120
ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggtgcttcta atcgtgcaac tgggggtccc 180
gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
cctgaagact ttgcgggtgta ttattgccag cagtattggt ctattcctat tacctttggc 300
cagggtagca aagttgaaat taaacgtacg gtggctgctc cgagcgtggt tatttttccg 360
ccgagcgatg aacaactgaa aagcggcacg gcgagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttt 420
tatccgcgtg aagcgaagt tcaagtggaa gtagacaacg cgctgcaaag cggcaacagc 480
caggaagcgc tgaccgaaca ggatagcaaa gatagcacct attctctgag cagcacctg 540
accctgagca aagcggatta tgaaaaacat aaagtgtatg cgtgcgaaat gaccatcaa 600
ggtctgagca gcccggtgac taaatctttt aatcgtggcg aggcc 645

```

10

<210> 114

<211> 663

15 <212> ADN

<213> Homo Sapien

<400> 114

20

```

caggtgcaat tgaaagaaa cggcccgccc ctggtgaaac cgacccaaac cctgaccctg 60
acctgtacct tttccggatt tagcctgtct aatcgtggtg gtggtgtggg ttggattcgc 120
cagccgcctg ggaaagccct cgagtggctg gcttggtatc attgggatga tgataagtct 180
tatagcacca gcctgaaaac gcgtctgacc attagcaaag atacttcgaa aaatcaggtg 240
gtgctgacta tgaccaacat ggaccgggtg gatacggcca cctattattg cgcgcgatg 300
catcttcctc ttgtttttga ttcttggggc caaggcaccc tgggtgacgt tagctcagcg 360
tcgaccaaa gtcgaagcgt gtttccgctg gctccgagca gcaaaagcac cagcggcggc 420
acggctgccc tgggctgcct gggttaaagat tatttcccg aaccagtcac cgtgagctgg 480
aacagcgggg cgctgaccag cggcgtgcat accttccgg cggtgctgca aagcagcggc 540
ctgtatagcc tgagcagcgt tgtgaccgtg ccgagcagca gcttaggcac tcagacctat 600
atgtgcaacg tgaaccataa accgagcaac accaaagtgg ataaaaaagt ggaaccgaaa 660
agc 663

```

<210> 115

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo Sapien

30

<400> 115

```

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

```

35 <210> 116

<211> 17

<212> PRT

40

<213> Homo Sapien

<400> 116

ES 2 659 406 T3

```

Asn Ile Ser Asn Asp Gly His Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1           5           10           15
Gly

<210> 117

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10 <400> 117

Phe Gln Ala Ser Tyr Leu Asp Ile Met Asp Tyr
 1           5           10

15 <210> 118

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Homo Sapien

<400> 118

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val His
25 1           5           10

<210> 119

<211> 7

30 <212> PRT

<213> Homo Sapien

35 <400> 119

Asn Asp Ser Asn Arg Pro Ser
 1           5

40 <210> 120

<211> 10

<212> PRT

45 <213> Homo Sapien

<400> 120

Gln Ala Trp Gly Asp Asn Gly Thr Arg Val
 1           5           10

50 <210> 121

<211> 7

55 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 121

60

```

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 122
 5 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 10 <400> 122
 Ser Asn Asp Gly His Tyr
 1 5
 15 <210> 123
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Homo Sapien
 <400> 123
 Phe Gln Ala Ser Tyr Leu Asp Ile Met Asp Tyr
 25 1 5 10
 <210> 124
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 35 <400> 124
 Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr
 1 5
 40 <210> 125
 <211> 3
 <212> PRT
 45 <213> Homo Sapien
 <400> 125
 Asn Asp Ser
 1
 50 <210> 126
 <211> 7
 55 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <400> 126
 60 Trp Gly Asp Asn Gly Thr Arg
 1 5

<210> 127

<211> 107

5

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 127

```

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

```

<210> 128

15

<211> 120

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 128

```

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

```

25

<210> 129

<211> 107

30

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 129

35

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

<210> 130

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 130

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

15

<210> 131

<211> 321

20

<212> ADN

<213> Homo Sapien

25 <400> 131

gatatcgaac tgacccagcc gccttcagt agcgttgac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtagcg gcgataatat tggttctaag tatgttcatt ggtaccagca gaaacccggg 120
 caggcgccag ttcttctgat ttataatgat tctaatactgc cctcaggcat cccggaacgc 180
 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgag accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg ccaggcttgg ggtgataatg gtactcgtgt gtttggcggc 300
 ggcacgaagt taaccgttct t 321

<210> 132

30

<211> 360

<212> ADN

35 <213> Homo Sapien

<400> 132

ES 2 659 406 T3

cagggtgcaat tgggtggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgagg cctccggatt taccttttct tcttatggta tgtcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atttctaata atggtcatta tacttattat 180
 gctgattctg ttaagggctg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggcgtgt attattgcgc gcgttttcag 300
 gcttcttata ttgatattat ggattattgg ggccaaggca ccctggtgac ggtagctca 360

<210> 133

5

<211> 212

<212> PRT

10 <213> Homo Sapien

<400> 133

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

<210> 134

20 <211> 222

<212> PRT

<213> Homo Sapien

25

<400> 134

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
		20						25					30		
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35						40					45			
Ser	Asn	Ile	Ser	Asn	Asp	Gly	His	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Phe	Gln	Ala	Ser	Tyr	Leu	Asp	Ile	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
	115						120					125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
	130					135					140				
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145					150					155					160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
			165					170						175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
			180					185					190		
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
	195					200					205				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser		
	210					215					220				

<210> 135

5 <211> 636

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 135

gatatcgaac	tgacccagcc	gccttcagtg	agcgttgcac	caggtcagag	cattaccatc	60
tcgtgtagcg	gcgataatat	tggttctaag	tatgttcatt	ggtaccagca	gaaacccggg	120
caggcgccag	ttcttgtgat	ttataatgat	tctaatacgtc	cctcaggcat	cccggaaacgc	180
tttagcggat	ccaacagcgg	caacaccgcg	accctgacca	ttagcggcac	tcaggcggaa	240
gacgaagcgg	attattattg	ccaggcttgg	ggtgataatg	gtactcgtgt	gtttggcggc	300
ggcacgaagt	taaccgttct	tgccagccg	aaagccgcac	cgagtgtgac	gctgtttccg	360
ccgagcagcg	aagaattgca	ggcgaacaaa	gcgaccctgg	tgtgcctgat	tagcgacttt	420
tatccgggag	ccgtgacagt	ggcctggaag	gcagatagca	gccccgtcaa	ggcgggagtg	480
gagaccacca	cacctccaa	acaaagcaac	aacaagtacg	cggccagcag	ctatctgagc	540
ctgacgcctg	agcagtggaa	gtcccacaga	agctacagct	gccaggtcac	gcatgagggg	600
agcaccgtgg	aaaaaacctg	tgcgccgact	gaggcc			636

15 <210> 136

<211> 666

<212> ADN

20

<213> Homo Sapien

<400> 136

```

caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcgcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatggta tgtcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atttctaata atggtcatta tacttattat 180
gctgattctg ttaagggtcg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggcogtgt attattgcgc gcgttttcag 300
gcttcttata ttgatattat ggattattgg ggccaaggca ccctggtgac ggtagctca 360
gcgtcgacca aaggtccaag cgtgtttccg ctggctccga gcagcaaaaag caccagcggc 420
ggcacggctg ccctgggctg cctgggttaa gattatttcc cggaaccagt caccgtgagc 480
tggaacagcg gggcgctgac cagcggcgctg catacctttc cggcggtgct gcaaagcagc 540
ggcctgtata gcctgagcag cgttgtgacc gtgccgagca gcagcttagg cactcagacc 600
tatatttgca acgtgaacca taaaccgagc aacaccaaag tggataaaaa agtggaaacc 660
aaaagc 666

```

<210> 137

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 137

```

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

```

15 <210> 138

<211> 120

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 138

```

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

```

25

<210> 139

<211> 321

30

<212> ADN

<213> Homo Sapien

5 <400> 139

```
agctatgaac tgaccagacc gctgagtgtt agcgttgccg tgggtcagac cgcgcgtatt 60
acctgcggcg gtgataacat tggcagcaaa tatgtgcatt ggtatcagca gaaaccgggc 120
caggcgccgg tgctgggtgat ttataacgat agcaaccgtc cgagcggcat tccggaacgt 180
tttagcggca gcaacagcgg caataaccgg accctgacca ttagccgtgc gcaggcgggt 240
gatgaagcgg attattattg ccaggcgtgg ggcgataatg gtacgcgtgt gtttggcggg 300
ggtacgaagt taaccgttct t 321
```

<210> 140

10 <211> 360

<212> ADN

15 <213> Homo Sapien

<400> 140

```
gagggtgcaat tgctggaaag cggcgccggc ctggtgcaac cggcgccgag cctgcgtctg 60
agctgcggcg cctccggatt taccttttct tcttatggta tgccttgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atttctaatt atggtcatta tacttattat 180
gctgattctg ttaagggctg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgttttcag 300
gcttcttatt ttgatattat ggattattgg ggccaaggca ccctggtgac ggtagctca 360
```

20 <210> 141

<211> 726

25 <212> ADN

<213> Homo Sapien

<400> 141

```
gatatcgttc tgaccagag tccggcaacc ctgagcctga gtccgggtga acgtgccacc 60
ctgagctgtc gtgcaagcca gtttatttgt agccgttatc tggcatggtg tcagcagaaa 120
ccgggtcagg caccgcgtct gctgatttat ggtgcaagca atcgtgcaac cgggtgtccg 180
gcacgtttta gcggtagcgg tagtggcacc gattttaccg tgaccattag cagcctggaa 240
ccggaagatt ttgcaacctt ttattgccag cagtattatg attatccgca gacctttggt 300
cagggcacca aggtggaaat taaaggttgt ggtggtagcg gtggtggtgg ctgaggttgt 360
ggcggtagtc aggttcaatt gaaagaaagc ggtccggcac tgggttaaacc gaccagacc 420
ctgaccctga catgtacctt tagcggtttt agcctgagca atcgtggtgg tgggtgttgt 480
tggattcgtc agcctccggg taaagcactg gaatggctgg catggattga ttgggatgat 540
gataaaagct atagcaccag cctgaaaacc cgtctgacca ttagtaaaaga taccagcaaa 600
aatcaggtgg ttctgaccat gaccaatatg gatccggttg ataccgccac ctattattgt 660
gcacgtatgc atctgccgct ggtttttgat agctggggtc agggtagact agttaccgtt 720
agcagc 726
```

<210> 142

35 <211> 242

<212> PRT

<213> Homo Sapien

40 <400> 142

ES 2 659 406 T3

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Ser	Arg
		20						25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50				55					60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Pro
			85						90					95	
Gln	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly
		100					105						110		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	
		115					120					125			
Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr
	130					135						140			
Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asn	Arg	Gly	Gly	Gly	Val	Gly
145					150					155					160
Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	Trp	Ile
			165						170					175	
Asp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys	Thr	Arg	Leu
			180					185					190		
Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Met	Thr
		195					200					205			
Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Met	His
	210					215					220				
Leu	Pro	Leu	Val	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
	225				230					235					240
Ser	Ser														

5 <210> 143

<211> 741

<212> ADN

10

<213> Homo Sapien

<400> 143

gatatcgtgc	tgacacagag	ccctgccacc	ctgtctctga	gccctggcga	gagagccacc	60
ctgagctgcc	gggccagcca	gttcatcggc	tcccgcctacc	tggcctggta	tcagcagaag	120
cccggacagg	ctcccagact	gctgatctac	ggcgccagca	acagagctac	cggcgtgccc	180
gccagatatt	ctggcagcgg	cagcggcacc	gacttcaccc	tgaccatcag	cagcctggaa	240
cccgaggact	tcgccaccta	ctactgccag	cagtactacg	actaccccca	gaccttcggc	300
cagggcacca	aggtggagat	caagggcgga	ggcgatccg	ggggtggcgg	aagtggaggc	360
ggaggaagcg	gagggggcgg	aagccaggtg	caattgaaag	agtccggccc	tgccctggtg	420
aagcctaccc	agaccctgac	cctgacatgc	accttcagcg	gcttcagcct	gagcaacaga	480
ggcggcggag	tgggctggat	cagacagcct	cccggcaagg	ccctggaatg	gctggcctgg	540
atcgactggg	acgacgacaa	gagctacagc	accagcctga	aaacccggct	gaccatctcc	600
aaggacacca	gcaagaacca	ggtggtgctc	acatgacca	acatggacc	cgtggacacc	660
gccacctatt	attgcgcccg	gatgcatctg	ccctggtgt	tcgatagctg	gggccaggga	720
accctggtga	cagtgtccag	c				741

<210> 144

<211> 247

20

<212> PRT

<213> Homo Sapien

25 <400> 144

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Ser	Arg
		20						25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50				55						60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Pro
			85						90					95	
Gln	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly
		100						105					110		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		115					120					125			
Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
	130					135					140				
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asn	Arg
145					150					155					160
Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
			165					170						175	
Trp	Leu	Ala	Trp	Ile	Asp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser
			180					185					190		
Leu	Lys	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
		195					200					205			
Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
	210				215						220				
Cys	Ala	Arg	Met	His	Leu	Pro	Leu	Val	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly
225					230					235					240
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
				245											

5 <210> 145

<211> 726

<212> ADN

10

<213> Homo Sapien

<400> 145

cagggttcaat	tgaagaaaag	cgggtccggca	ctgggttaaac	cgacccagac	cctgaccctg	60
acatgtacct	ttagcgggtt	tagcctgagc	aatcgtggtg	gtgggtgttg	ttggattcgt	120
cagcctccgg	gtaaagcact	ggaatggctg	gcatggattg	attgggatga	tgataaaagc	180
tatagcacca	gcctgaaaac	ccgtctgacc	attagcaaag	ataccagcaa	aaatcagggt	240
gttctgacca	tgaccaatat	ggatccggtt	gataccgcaa	cctattattg	tgacacgtatg	300
catctgccgc	tggtttttga	tagctggggt	cagggtacac	tagttaccgt	tagcagcggg	360
ggtggtggta	gcgggtgggtg	cggttcagg	ggtggtggca	gtgatatcgt	tctgacccag	420
agtccggcaa	ccctgagcct	gagtcgggt	gaacgtgcca	ccctgagctg	tcgtgcaagc	480
cagtttattg	gtagccgtta	tctggcatgg	tatcagcaga	aaccgggtca	ggcaccgcgt	540
ctgctgattt	atggtgcaag	caatcgtgca	accggtgttc	cggcacgttt	tagcggtagc	600
ggtagtggca	ccgattttac	cctgaccatt	agtagcctgg	aaccggaaga	ttttgccacc	660
tattattgcc	agcagtatta	tgattatccg	cagacctttg	gtcagggcac	caaggtggaa	720
attaaa						726

<210> 146

<211> 242

20

<212> PRT

<213> Homo Sapien

25 <400> 146

ES 2 659 406 T3

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Arg
 20 25 30
 Gly Gly Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Trp Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60
 Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Met His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr
 130 135 140
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly
 180 185 190
 Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys

5 <210> 147

<211> 741

<212> ADN

10

<213> Homo Sapien

<400> 147

cagggttcaat tgaagaaaag cgggtccggca ctgggttaaac cgacccagac cctgaccctg 60
 acatgtacct ttagcgggtt tagcctgagc aatcgtggtg gtggtgttg ttggattcgt 120
 cagcctccgg gtaaagcact ggaatggctg gcatggattg attgggatga tgataaaagc 180
 tatagcacca gcctgaaaac ccgtctgacc attagcaaag ataccagcaa aaatcagggt 240
 gttctgacca tgaccaatat ggatccgggt gataccgcaa cctattattg tgcacgtatg 300
 catctgccgc tggtttttga tagctggggt cagggtacac tagttaccgt tagcagcgggt 360
 ggtggtggtg gcggtggtg cggttcagggt ggtggtggca gtggcggtg tggtagtgat 420
 atcgttctga ccagagtc ccgaaccctg agcctgagtc cgggtgaacg tgccaccctg 480
 agctgtcgtg caagccagtt tattggtagc cgttatctg catggtatca gcagaaaccg 540
 ggtcaggcac cgcgtctgct gatttatggt gcaagcaatc gtgcaaccgg tgttccggca 600
 cgtttttagc gtagcggtag tggcaccgat tttaccctga ccattagtag cctggaaccg 660
 gaagattttg ccacctatta ttgccagcag tattatgatt atccgcagac ctttggtcag 720
 15 ggcaccaagg tggaaattaa a 741

<210> 148

<211> 247

20

<212> PRT

<213> Homo Sapien

25 <400> 148

ES 2 659 406 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asn	Arg
			20					25					30		
Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	Trp	Ile	Asp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser
50					55						60				
Leu	Lys	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75				80	
Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
			85						90					95	
Cys	Ala	Arg	Met	His	Leu	Pro	Leu	Val	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	Thr
130					135						140				
Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu
145					150					155					160
Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Ser	Arg	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr
			165						170					175	
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser
			180					185					190		
Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
		195					200					205			
Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala
210					215						220				
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly	Gln
225				230						235					240
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys									
				245											

<210> 149

5 <211> 732

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 149

```

gatatcgaac  tgacccagcc  tccgagcgtt  agcgttgcac  cgggtcagac  cgcacgtatt  60
agctgtagcg  gtgatagcct  gcgtaataaa  gtttattggt  atcagcagaa  accgggtcag  120
gcaccgggttc  tggttattta  taaaaataat  cgtccgagcg  gtattccgga  acgttttagc  180
ggtagcaata  gcggtaatac  cgcaaccctg  accattagcg  gcaccaggc  agaagatgaa  240
gcagattatt  attgccagag  ctatgatggt  cagaaaagcc  tgggttttgg  tgggtggcacc  300
aagcttaccg  ttctgggtgg  tgggtggtagc  ggtggtggtg  gctcaggtgg  tggcggttct  360
caggttcaat  tggttgaaag  tgggtggtggt  ctggttcagc  ctggtggtag  cctgcgtctg  420
agctgtgcag  caagcgggtt  taccttagc  gattatgtga  ttaattgggt  tcgccaggca  480
ccgggtaaag  gtctggaatg  ggtagcgggt  attagctggt  cagggtgtta  taccattat  540
gcagatagcg  tgaaaggctg  ttttaccatt  agccgtgata  atagcaaaaa  taccctgtat  600
ctgcagatga  atagcctgcg  tgcagaagat  accgcagttt  attattgtgc  acgtctgggt  660
gcaaccgcaa  ataataattc  ctataaattt  atggatgtgt  ggggtcaggg  tacactagtt  720
accgttagca  gc  732

```

15 <210> 150

<211> 244

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 150

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Tyr
 20 25 30
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Lys
 35 40 45
 Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 50 55 60
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu
 65 70 75 80
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly Gln Lys Ser Leu Val Phe
 85 90 95
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 130 135 140
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val
 165 170 175
 Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 180 185 190
 Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 195 200 205
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Ala Thr Ala Asn
 210 215 220
 Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 225 230 235 240
 Thr Val Ser Ser

<210> 151

5 <211> 747

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10 <400> 151

gatatcgaac tgacccagcc tccgagcgtt agcgttgcac cgggtcagac cgcacgtatt 60
 agctgtagcg gtgatagcct gcgtaataaa gtttattggt atcagcagaa accgggtcag 120
 gcaccgggttc tggttattta taaaaataat cgtccgagcg gtattccgga acgttttagc 180
 ggtagcaata gcggtataac cgcaaccctg accattagcg gcacccagcg agaagatgaa 240
 gcagattatt attgccagag ctatgatggt cagaaaagcc tggttttttg tggtggcacc 300
 aagcttaccg ttctgggtgg tggtggtagc ggtggtggtg gctcaggtgg tggcggttct 360
 ggtggcgggtg gttcacaggt tcaattggtt gaaagtgggtg gtggtctggt tcagcctggt 420
 ggtagcctgc gtctgagctg tgcagcaagc ggttttacct ttagcgatta tgtgattaat 480
 tgggttcgcc aggcaccggg taaaggtctg gaatgggtta gcggtattag ctggtcaggt 540
 gttaataccc attatgcaga tagcgtgaaa ggtcgtttta ccattagccg tgataatagc 600
 aaaaataccc tgtatctgca gatgaatagc ctgcgtgcag aagataccgc agtttattat 660
 tgtgcacgtc tgggtgcaac cgcaaataat attcgtata aatttatgga tgtgtggggg 720
 cagggtacac tagttaccgt tagcagc 747

15 <210> 152

<211> 249

<212> PRT

20 <213> Homo Sapien

<400> 152

ES 2 659 406 T3

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Tyr
 20 25 30
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Lys
 35 40 45
 Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 50 55 60
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu
 65 70 75 80
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly Gln Lys Ser Leu Val Phe
 85 90 95
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
 115 120 125
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Val Ile Asn
 145 150 155 160
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile
 165 170 175
 Ser Trp Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 180 185 190
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 195 200 205
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu
 210 215 220
 Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp Val Trp Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 153

5 <211> 732

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10 <400> 153

caggttcaat tgggtgaaag cgggtggtggt ctggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60
 agctgtgcag caagcgggtt taccttttagc gattatgtga ttaattgggt tcgtcaggca 120
 ccgggtaaag gtctggaatg ggtagcgggt attagctggt caggtgttaa taccattat 180

gcagatagcg tgaaaggtcg ttttaccatt agccgtgata atagcaaaaa taccctgtat 240
 ctgcagatga atagcctgcg tgcagaagat accgcagttt attattgtgc acgtctgggt 300
 gcaaccgcaa ataattattcg ctataaatat atggatgtgt ggggtcaggg tacactagtt 360
 accgttagca gtggtggtgg tggtagcgggt ggtggcggat ctggtggcgg tggcagtgat 420
 atcgaaactga ccagcctcc gagcgttagc gttgcaccgg gtcagaccgc acgtattagc 480
 tgtagcgggtg atagtctgcg taataaagtt tattggtatc agcagaaacc gggtcagggt 540
 ccggttctgg ttatttataa aaataatcgt ccgagcggta ttccggaacg ttttagcgggt 600
 agcaatagcg gtaataaccgc aaccctgacc attagcggca ccaggcaga agatgaagcc 660
 gattattatt gtcagagcta tgatggtcag aaaagcctgg tttttggtgg tggcaccaag 720
 15 cttaccgttc tg 732

<210> 154

<211> 244

20 <212> PRT

<213> Homo Sapien

25 <400> 154

ES 2 659 406 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr
 130 135 140
 Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser
 145 150 155 160
 Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 180 185 190
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 195 200 205
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Gln Ser Tyr Asp Gly Gln Lys Ser Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Leu

<210> 155

5 <211> 747

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10 <400> 155

caggttcaat tgggtgaaag cgggtggtggt ctggttcagc ctggtggttag cctgcgtctg 60
 agctgtgcag caagcgggtt tacctttagc gattatgtga ttaattgggt tcgtcaggca 120
 ccgggtaaag gtctggaatg ggtagcgggt attagctggt caggtgttaa taccattat 180
 gcagatagcg tgaaaggctg ttttaccatt agcgtgata atagcaaaa taccctgtat 240
 ctgcagatga atagcctgcg tgcagaagat accgcagttt attattgtgc acgtctgggt 300
 gcaaccgcaa ataataattc ctataaattt atggatgtgt ggggtcaggg tacactagtt 360
 accgttagca gtggtggtg tggtagcggg ggtggcggat ctggtggcgg tgggtcaggt 420
 ggtggtggca gtgatatcga actgaccag cctccgagcg ttagcgttgc accgggtcag 480

accgcacgta ttagctgtag cgggtgatagt ctgcgtaata aagtttattg gtatcagcag 540
 aaaccgggtc aggtccgggt tctggttatt tataaaaata atcgtccgag cggatttccg 600
 gaacgtttta gcggtagcaa tagcgttaat accgcaacc tgaccattag cggcaccag 660
 gcagaagatg aagccgatta ttattgtcag agctatgatg gtcagaaaag cctggttttt 720
 ggtggtggca ccaagcttac cgttctg 747

<210> 156

<211> 249

20 <212> PRT

<213> Homo Sapien

25 <400> 156

ES 2 659 406 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 145 150 155 160
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Tyr
 165 170 175
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Lys
 180 185 190
 Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 195 200 205
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu
 210 215 220
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly Gln Lys Ser Leu Val Phe
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 245

<210> 157

5 <211> 723

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10 <400> 157

gatatcgaac tgacccagcc tccgagcgtt agcgttgccac cgggtcagac cgcacgtatt 60
 agctgtagcg gtgataatat tggcagcaaa tatgtgcatt ggtatcagca gaaaccgggt 120
 caggcaccgg ttctggttat ttatggtgat agcaatcgctc cgagcgggat tccggaacgt 180
 tttagcggta gcaatagcgg taataaccgca accctgacca ttagcggcac ccaggcagaa 240
 gatgaagcag attattattg taccctgacc agcaccccga ttagcgggtgt ttttggtggt 300
 ggcaccaagc ttaccgttct ggggtggtggt ggtagcgggtg gtggtggctc aggtggtggt 360
 gggtcacagg ttcaattggt tgaaagtgggt ggtggtctgg ttcagcctgg tggtagcctg 420
 cgtctgagct gtgcagcaag cggttttacc tttagcgtta atggtatgca ttgggttcgc 480
 caggcaccgg gtaaagggtct ggaatgggtt agcgttattg atggtatggg ccataacctat 540
 tatgccgata gcgttaaagg tcgttttacc attagccgtg ataatagcaa aaataccctg 600
 tatctgcaga tgaatagcct gcgtgcagaa gataccgcag tttattattg cgcacgctat 660
 gattatatta aatatggtgc ctttgatccg tggggtcagg gtacactagt taccgttagc 720
 agc 723

15 <210> 158

<211> 241

<212> PRT

20 <213> Homo Sapien

<400> 158

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Thr Pro Ile Ser Gly
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 130 135 140
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Asn Gly Met His Trp Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Asp Gly Met
 165 170 175
 Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 180 185 190
 Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 195 200 205
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Ile Lys
 210 215 220
 Tyr Gly Ala Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 225 230 235 240
 Ser

<210> 159

5 <211> 738

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 159

gatatcgaac tgacccagcc tccgagcggt agcggtgcac cgggtcagac cgcacgtatt 60
 agctgtagcg gtgataatat tggcagcaaa tatgtgcatt ggtatcagca gaaaccgggt 120
 caggcaccgg ttctgggttat ttatggtgat agcaatcgct cgagcgggtat tccggaacgt 180
 ttttagcggta gcaatagcgg taataccgca accctgacca ttagcggcac ccaggcagaa 240
 gatgaagcag attattattg taccgtacc agcaccgccga ttagcgggtgt ttttggtggt 300
 ggcaccaagc ttaccgttct ggggtggtggt ggtagcgggtg gtggtggctc aggtggtggc 360
 ggttctggtg gcggtggttc acaggttcaa ttggttgaaa gtggtggtgg tctggttcag 420
 cctggtggtg gcctgcgtct gagctgtgca gcaagcgggt ttacctttag cgttaatggt 480
 atgcattggg ttgcgccagg accgggtaaa ggtctggaat gggttagcgt tattgatggt 540
 atgggccata cctattatgc cgatagcggt aaaggtcggt ttaccattag ccgtgataat 600
 agcaaaaata ccctgtatct gcagatgaat agcctgcgtg cagaagatac cgcagtttat 660
 tattgcgcac gctatgatta tattaatat ggtgcctttg atccgtgggg tcagggtaca 720
 ctagttaccg ttagcagc 738

15 <210> 160

<211> 246

<212> PRT

20

<213> Homo Sapien

<400> 160

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Thr Pro Ile Ser Gly
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln
 115 120 125
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 130 135 140
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Asn Gly
 145 150 155 160
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 165 170 175
 Val Ile Asp Gly Met Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 180 185 190
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 195 200 205
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 210 215 220
 Tyr Asp Tyr Ile Lys Tyr Gly Ala Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 161

5 <211> 723

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10 <400> 161

caggttcaat tggttgaaag cgggtggtggt ctggttcagc ctggtggttag cctgcgtctg 60
 agctgtgcag caagcgggtt taccttttagc gttaaatggta tgcattgggt tcgtcaggca 120
 ccgggtaaaag gtctggaatg ggtagcgtt attgatggta tgggccatac ctattatgcc 180
 gatagcgtta aaggctcgtt taccattagc cgtgataata gcaaaaatac cctgtatctg 240
 cagatgaata gcctgcgtgc agaagatacc gcagtttatt attgtgcccg ttatgattat 300
 attaaatatg gtgcctttga tccgtggggt cagggtacac tagttaccgt tagcagtgggt 360
 ggtggtggta gcggtggtgg cggatctggt ggcggtggtt cagatatcga actgaccagg 420
 cctccgagcg ttagcgttgc accgggtcag accgcacgta ttagctgtag cggtgataat 480
 attgacagca aatatgtgca ttggtatcag cagaaaccgg gtcaggctcc ggttctggtt 540
 atttatggtg atagcaatcg tccgagcggg attccggaac gtttttagcgg tagcaatagc 600
 ggtaataacc caaccctgac cattagcggc acccaggcag aagatgaagc cgattattat 660
 tgcacccgta ccagcaccac gattagcggg gtttttggtg gtggcaccaa gcttaccggt 720
 ctg 723

15 <210> 162

<211> 241

<212> PRT

20 <213> Homo Sapien

<400> 162

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Asn
 25

ES 2 659 406 T3

[illegible]

<210> 163

5

<211> 738

<212> ADN

10 <213> Homo Sapien

<400> 163

caggttcaat	tgggttgaag	cgggtggtggt	ctggttcagc	ctggtggtag	cctgcgtctg	60
agctgtgcag	caagcggttt	tacctttagc	gttaaatgga	tgcaattgggt	tcgtcaggga	120
ccgggtgaag	gctctgaagt	ggttagcggt	attgatggga	tggggccatac	ctattatgcc	180
gatagcggtta	aaggtcggtt	taccattagc	ctgtataata	gcaaaaatac	ctctgatctc	240
cagatgaata	gcctgcgtgc	agaagatacc	gcagttttatt	attgtgcccc	ttatgattat	300
attaaatatg	gtcgctttga	tccgtggggt	cagggtagac	tagttaccgt	tagcagtggt	360
ggtggtggta	gcgggtggtg	cggatctggt	ggcggtcggt	caaggtggtgg	tggcagtgat	420
atcgaaactga	ccagcgtctc	gagcgttagc	gttgcaaccg	gtcagaccgc	acgtattagc	480
tgtagcggtg	ataatattgg	cagcaaatat	gtgcattggt	atcacgagaa	accgggtcag	540
gctccgggttc	tggttattta	tggatgtagc	aatcgtccga	gcggtattcc	ggaacgtttt	600
agcggtagca	atagcgttaa	taccgcaacc	ctgaccatta	gcggcaccca	ggcagaagat	660
gaagccgatt	attattgcac	ccgtaccagc	accccgatta	gcggtgtttt	tgggtggtggc	720
accaagctta	ccgttctg					738

15

<210> 164

<211> 246

20 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 164

25

ES 2 659 406 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Val	Asn
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Val	Ile	Asp	Gly	Met	Gly	His	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	50					55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
			85						90					95	
Arg	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ala	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	115						120					125			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr
	130					135					140				
Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Ile	Ser
145						150				155					160
Cys	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Tyr	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln
				165					170					175	
Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Gly	Asp	Ser	Asn	Arg
			180					185					190		
Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr
		195					200					205			
Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr
	210					215					220				
Tyr	Cys	Thr	Arg	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Ser	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Gly
225					230					235					240
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu										
				245											

- 5 <210> 165
- <211> 2121
- <212> ADN
- 10 <213> Homo Sapien
- <400> 165

15

20

25

30

35

```

caggtgcaat tgggtcgagtc tggcgaggga ctggtgcagc ctggtggcag cctgagactg 60
agctgcgccg ccagcgggctt cacccttcagc gactacgtga tcaactgggt gcgacaggcc 120
cctggaaggg gcctggaatg ggtgtccggc atctcttggg ctggcggtgaa caccactac 180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagactgggc 300
gccaccgccca acaacatccg gtacaagtgc atggacgtgt gggggccaggg cacactgggtg 360
accgtcagct cagctagcac caagggcccc agcgtgttcc ccctggcccc cagcagcaag 420
agcaccagcg gcggcacagc cgccctgggc tgcctgggtga aggactactt ccccgagccc 480
gtgaccgtgt cctggaacag cggagccctg acctccggcg tgcacacctt ccccgccgtg 540
ctgcagagca gcggcctgta cagcctgtcc agcgtgggtga cagtggccag cagcagcctg 600
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
agagtggagc ccaagagctg cgacaagacc cacacctgcc cccctgcccc agccccagag 720
gcagcggggc gaccctccgt gttcctgttc cccccaagc ccaaggacac cctgatgatc 780
agcaggaccc ccgaggtgac ctgcgtggtg gtggacgtga gccacgagga cccagagggtg 840
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag 900
gagcagtaca acagcaccta cagggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccagactgg 960
ctgaacggca aggaatacaa gtgcaaggtc tccaacaagg ccctgccagc ccccatcgaa 1020
aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca cgggagcccc aggtgtacac cctgcccccc 1080
tccccggagg gatgaccaa gaaccagggtg tccctgacct gtctgggtgaa gggcttctac 1140
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc 1200
acccccccag tgctggacag cgacggcagc ttcttcctgt acagcaagct gaccgtggac 1260
aagtcacagt ggcagcaggg caacgtgttc agctgcagcg tgatgcacga agcgtgcac 1320
aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tccccggca agggcggtc cggcggaagc 1380
gatatcgtgc tgacacagag ccctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 1440
ctgagctgcc gggccagcca gttcatcggc tcccgctacc tggcctggtg tcagcagaag 1500
cccgacaggg ctcccagact gctgatctac ggcgccagca acagagctac cggcgtgccc 1560
gccagathtt ctggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggaa 1620
cccagggact tcgccacctt ctactgccag cagtactacg actaccccca gaccttcggc 1680
cagggcacca aggtggagat caagggcgga ggcggatccg ggggtggcgg aagtggaggc 1740
ggaggaagcg gagggggcgg aagccaggtg caattgaaag agtccggccc tgccctgggtg 1800
aagcctaccc agaccctgac cctgacatgc accttcagcg gcttcagcct gagcaacaga 1860
ggcggcggag tgggctggat cagacagcct cccggcaagg ccctggaatg gctggcctgg 1920
atcgactggg acgacgacaa gagctacagc accagcctga aaaccggct gaccatctcc 1980

aaggacacca gcaagaacca ggtggtgctc accatgacca acatggaccc cgtggacacc 2040
gccacctatt attgcgcccg gatgcactcg cccctgggtg tcgatagctg gggccaggga 2100
accctggtga cagtgtccag c 2121

```

5

<210> 166

<211> 707

10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 166

15

20

25

30

35

ES 2 659 406 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
			20					25					30		
Val	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Ser	Gly	Val	Asn	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Leu	Gly	Ala	Thr	Ala	Asn	Asn	Ile	Arg	Tyr	Lys	Phe	Met	Asp
			100					105					110		
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
		115					120					125			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145					150					155					160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
			165						170					175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180					185					190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
		195					200					205			
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
	210					215					220				
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
225					230					235					240
Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
			245						250					255	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260					265					270		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
		275					280					285			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Gln	Tyr	Asn	
		290				295					300				
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
305					310					315					320
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
				325					330					335	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
			340					345					350		
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
		355					360					365			
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
					375						380				
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
385					390					395					400
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				405					410					415	
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
			420					425					430		
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu

ES 2 659 406 T3

```

      435      440      445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu
450      455      460
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
465      470      475      480
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr Leu Ala Trp
      485      490      495
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
500      505      510
Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
515      520      525
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe
530      535      540
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Gln Thr Phe Gly
545      550      555      560
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
      565      570      575
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
580      585      590
Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu
595      600      605
Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Arg Gly Gly Gly Val
610      615      620
Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Trp
625      630      635      640
Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Thr Arg
      645      650      655
Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met
660      665      670
Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met
675      680      685
His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
690      695      700
Val Ser Ser
705

```

<210> 167

5 <211> 105

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 167

```

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

```

15 <210> 168

<211> 315

<212> ADN

20

<213> Homo Sapien

<400> 168

```

gacatcgagc tgaccagacc cccttctgtg tctgtggccc ctggccagac cgccagaatc 60
agctgcagcg gcgacagcct gcggaacaag gtgtactggc atcagcagaa gcccggccag 120
gctcccgtgc tggatgatcta caagaacaac cggcccagcg gcatccctga gcggttcagc 180
ggcagcaaca gcggaatac cgccaccctg accatcagcg gcacccagcg cgaagatgag 240
gccgactact actgccagag ctacgacggc cagaaaagcc tgggtgttcgg cggaggcacc 300
aagcttaccg tgctg

```

<210> 169

5

<211> 633

<212> ADN

10 <213> Homo Sapien

<400> 169

```

gacatcgagc tgaccagacc cccttctgtg tctgtggccc ctggccagac cgccagaatc 60
agctgcagcg gcgacagcct gcggaacaag gtgtactggc atcagcagaa gcccggccag 120
gctcccgtgc tggatgatcta caagaacaac cggcccagcg gcatccctga gcggttcagc 180
ggcagcaaca gcggaatac cgccaccctg accatcagcg gcacccagcg cgaagatgag 240
gccgactact actgccagag ctacgacggc cagaaaagcc tgggtgttcgg cggaggcacc 300
aagcttaccg tgctgggcca gcccaaagcc gccctagcg tgaccctgtt cccccccagc 360
agcgaggaac tgcaggccaa caaggccacc ctggtctgcc tgatcagcga cttctaccct 420
ggcgccgtga ccgtggcctg gaaggccgac agcagccccg tgaaggccgg cgtggagaca 480
accaccccc gcaagcagag caacaacaag tacgccgcca gcagctacct gaggctgacc 540
cccagcagc ggaagagcca cagaagctac agctgccagg tcacccacga gggcagcacc 600
gtggagaaaa ccgtggcccc caccgagtgc agc

```

15

<210> 170

<211> 211

20 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 170

25

```

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

```

<210> 171

<211> 706

<212> PRT

5

<213> Homo Sapien

<400> 171

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr
 450 455 460
 Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
 465 470 475 480
 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr
 485 490 495
 10 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser

Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
515							520					525			
Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala
530							535					540			
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly	Gln
545							550				555				560
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
				565						570				575	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Lys
			580						585				590		
Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr
			595				600					605			
Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asn	Arg	Gly	Gly	Gly	Val	Gly
610							615					620			
Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	Trp	Ile
625						630				635					640
Asp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys	Thr	Arg	Leu
					645					650				655	
Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Met	Thr
			660					665					670		
Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Met	His
		675					680					685			
Leu	Pro	Leu	Val	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
	690						695					700			
Ser	Ser														
705															

<210> 172

5 <211> 2118

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 172

caggtgcaat	tggtcgagtc	tggcggagga	ctggtgcagc	ctggtggcag	cctgagactg	60
agctgcgccg	ccagcgggctt	caccttcagc	gactacgtga	tcaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggaaagg	gcctggaatg	ggtgtccggc	atctcttggt	ctggcgtgaa	caccactac	180
gcccacagcg	tgaagggccg	gttcaccatc	agccgggaca	acagcaagaa	caccctgtac	240
ctgcagatga	acagcctgag	agccgaggac	accgccgtgt	actactgtgc	cagactgggc	300
gccaccgcca	acaacatccg	gtacaagtcc	atggacgtgt	ggggccaggg	cacactgggtg	360
accgtcagct	cagctagcac	caagggcccc	agcgtgttcc	ccctggcccc	cagcagcaag	420
agcaccagcg	gcggcacagc	cgccctgggc	tgccctggga	aggactactt	ccccgagccc	480
gtgaccgtgt	cctggaacag	cggagccctg	acctccggcg	tgccacacctt	ccccgcccgtg	540
ctgcagagca	gcggcctgta	cagcctgtcc	agcgtggtga	cagtgccccag	cagcagcctg	600
ggcaccacaga	cctacatctg	caacgtgaac	cacaagccca	gcaacaccaa	ggtggacaag	660
agagtggagc	ccaagagctg	cgacaagacc	cacacctgcc	ccccctgccc	agccccagag	720
gcagcgggcg	gaccctccgt	gttcctgttc	ccccccaagc	ccaaggacac	cctgatgatc	780
agcaggagccc	ccgaggtgac	ctgcgtggtg	gtggacgtga	gccacgagga	cccagaggtg	840
aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcacaacg	ccaagaccaa	gcccagagag	900
gagcagtaca	acagcaccta	cagggtggtg	tccgtgctga	ccgtgctgca	ccaggactgg	960
ctgaaccggca	aggaatacaa	gtgcaaggtc	tccaacaagg	ccctgccagc	ccccatcgaa	1020
aagaccatca	gcaaggccaa	gggccagcca	cgggagcccc	aggtgtacac	cctgcccccc	1080
tcccgggagg	agatgaccaa	gaaccaggtg	tccctgacct	gtctggtgaa	gggcttctac	1140
cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	aacggccagc	ccgagaacaa	ctacaagacc	1200
acccccccag	tgtctggacag	cgacggcagc	ttcttcctgt	acagcaagct	gaccctggac	1260
aagtcacaggt	ggcagcaggg	caacgtgttc	agctgcagcg	tgatgcacga	agcgtgcac	1320
aaccactaca	cccagaagag	cctgagcctg	tcccccgcg	gcggctcccg	cggaaagcgat	1380
atcgtgctga	cacagagccc	tgccaccctg	tctctgagcc	ctggcgagag	agccaccctg	1440
agctgcgggg	ccagccagtt	catcggtccc	cgctacctgg	cctgggtatca	gcagaagccc	1500
ggacaggctc	ccagactgct	gatctacggc	gccagcaaca	gagctaccgg	cgtgcccggc	1560
agattttctg	gcagcggcag	cggcaccgag	ttcacccctga	ccatcagcag	cctggaaccc	1620
gaggacttcg	ccacctacta	ctgccagcag	tactacgact	acccccagac	cttcggccag	1680
ggcaccgaag	tggagatcaa	gggaggaggg	ggatccgggg	gtggcggaag	tggaggcgga	1740
ggaagcggag	ggggcggaag	ccaggtgcaa	ttgaaagagt	ccggccctgc	cctggtgaag	1800

```
cctaccacaga ccctgaccct gacatgcacc ttcagcggct tcagcctgag caacagaggc 1860
ggcggagtgg gctggatcag acagcctccc ggcaaggccc tggaatggct ggcctggatc 1920
gactgggacg acgacaagag ctacagcacc agcctgaaaa cccggctgac catctccaag 1980
gacaccagca agaaccaggt ggtgctcacc atgaccaaca tggaccccggt ggacaccgcc 2040
acctattatt gcgcccggat gcatctgccc ctggtgttcg atagctgggg ccaggaacc 2100
ctggtgacag tgtccagc 2118
```

<210> 173

5 <211> 707

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 173

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20      25      30
Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Arg Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp
100      105      110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115      120      125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130      135      140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145      150      155      160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165      170      175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180      185      190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195      200      205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210      215      220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225      230      235      240
Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245      250      255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260      265      270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275      280      285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290      295      300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305      310      315      320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325      330      335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340      345      350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355      360      365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370      375      380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385      390      395      400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405      410      415
```

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu
 450 455 460
 Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 465 470 475 480
 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr Leu Ala Trp
 485 490 495
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
 500 505 510
 Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 515 520 525
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe
 530 535 540
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Gln Thr Phe Gly
 545 550 555 560
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 565 570 575
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
 580 585 590
 Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu
 595 600 605
 Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Arg Gly Gly Gly Val
 610 615 620
 Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Trp
 625 630 635 640
 Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Thr Arg
 645 650 655
 Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met
 660 665 670
 Thr Asn Met Asp Ala Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met
 675 680 685
 His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 690 695 700
 Val Ser Ser
 705

<210> 174

5 <211> 2121

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 174

cagggtgcaat tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggtggcag cctgagactg 60
 agctgcgcgc ccagcggcct cacttcagc gactacgtga tcaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg ggtgtccggc atctcttgggt ctggcgtgaa caccactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagactgggc 300
 gccaccgcca acaacatccg gtacaagttc atggacgtgt ggggccaggg cacactggtg 360
 accgtcagct cagctagcac caaggcccc agcgtgttcc ccctggcccc cagcagcaag 420
 agcaccagcg gcggcacagc cgccctgggc tgcctggtga aggactactt ccccgagccc 480
 gtgaccgtgt cctggaacag cggagccctg acctccggcg tgcacacctt ccccgccgtg 540
 ctgcagagca gcggcctgta cagcctgtcc agcgtggtga cagtgccag cagcagcctg 600
 ggcaccagca cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
 agagtggagc ccaagagctg cgacaagacc cacacctgcc cccctgccc agcccagag 720
 gcagcgggcg gaccctccgt gttcctgttc cccccaagc ccaaggacac cctgatgatc 780
 agcaggaccc ccgaggtgac ctgcgtggtg gtggacgtga gccacgagga cccagagggtg 840
 aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag 900
 gagcagtaca acagcaccta cagggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 960
 ctgaacggca aggaatacaa gtgcaaggtc tccaacaagg ccctgccagc ccccatcgaa 1020
 aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca cgggagcccc aggtgtacac cctgcccccc 1080
 tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtg tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac 1140

```

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc 1200
acccccccag tgctggacag cgacggcagc ttcttcctgt acagcaagct gaccgtggac 1260
aagtcacaggt ggacgagagg caacgtgttc agctgcagcg tgatgcacga agcgctgcac 1320
aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tccccgggca agggcggtc cggcggaagc 1380
gatatcgtgc tgacacagag ccctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 1440
ctgagctgcc gggccagcca gttcatcggc tcccgtacc tggcctggtg tcagcagaag 1500
cccgacaggg ctcccagact gctgatctac ggcgccagca acagagctac cggcgtgccc 1560
gccagatttt ctggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggaa 1620
cccaggagact tcgccaccta ctactgccag cagtactacg actaccccca gaccttcggc 1680
cagggcacca aggtggagat caaggcgga ggcggatccg ggggtggcgg aagtggaggc 1740
ggaggaagcg gagggggcgg aagccaggtg caattgaaag agtccggccc tgcctggtg 1800
aagcctaccc agaccctgac cctgacatgc acctcagcg gcttcagcct gagcaacaga 1860
ggcggcggag tgggctggat cagacagcct cccggcaagg ccctggaatg gctggcctgg 1920
atcgactggg acgacgacaa gagctacagc accagcctga aaacccggct gaccatctcc 1980
aaggacacca gcaagaacca ggtggtgctc accatgacca acatggacgc cgtggacacc 2040
gccacctatt attgcgcccg gatgcacatg cccctggtgt tcgatagctg gggccaggga 2100
accctggtga cagtgtccag c 2121

```

<210> 175

5 <211> 707

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 175

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20          25          30
Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp
100          105          110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115          120          125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130          135          140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145          150          155          160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165          170          175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180          185          190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195          200          205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210          215          220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225          230          235          240
Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245          250          255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260          265          270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275          280          285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290          295          300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305          310          315          320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro

```

ES 2 659 406 T3

				325					330					335	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
			340					345					350		
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
		355					360					365			
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
	370					375				380					
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
385						390				395					400
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
			405					410						415	
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
		420					425					430			
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
	435					440						445			
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu
	450					455				460					
Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr
465					470					475					480
Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Ser	Arg	Tyr	Leu	Ala	Trp
				485					490					495	
Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala
			500					505					510		
Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
	515					520						525			
Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe
	530					535				540					
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly
545					550					555					560
Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
			565					570						575	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu
			580				585						590		
Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu
	595					600					605				
Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asn	Arg	Gly	Gly	Gly	Val
	610				615					620					
Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	Trp
625					630				635						640
Ile	Asp	Trp	Asp	Asp	Lys	Ser	Tyr	Ser	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys	Thr	Arg
			645					650						655	
Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Met
			660				665					670			
Thr	Asn	Met	Thr	Ala	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Met
	675					680									

<210> 176

5 $\langle 211 \rangle$ 2121

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 176

cagggtgcaat	tgggtcgagtc	tggcgaggga	ctggtgcagc	ctggtggcag	cctgagactg	60
agctgcgccg	ccagcggctt	caccttcagc	gactactgtg	tcaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggaaagg	gcctggaatg	ggtgtccggc	atctcttggt	ctggcgtgaa	caccctacta	180
gccgacagcg	tgaagggccg	gttcaccatc	agccgggaca	acagcaagaa	caccctgtac	240
ctgcagatga	acagcctgag	agccgaggac	accgccgtgt	actactgtgc	cagactgggc	300
gccaccgcga	acaacatccg	gtacaagttc	atggacgtgt	ggggccaggg	cacactggtg	360
accgtcagct	cagctagcac	caagggtccc	agcgtgttcc	ccctggcccc	cagcagcaag	420
agccaccagcg	cgccacacgc	cgccctgggc	tgctctgtga	aggaactact	ccccgaagcc	480

```

gtgaccgtgt cctggaacag cggagccctg acctccggcg tgcacacctt ccccgccgtg 540
ctgcagagca gcggcctgta cagcctgtcc agcgtggtga cagtgccag cagcagcctg 600
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
agagtggagc ccaagagctg cgacaagacc cacacctgcc cccctgccc agccccagag 720
gcagcgggcg gacctccgt gttcctgttc cccccaagc ccaaggacac cctgatgac 780
agcaggacc cagaggtgac ctgctggtg gtggacgtga gccacgagga cccagaggtg 840
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaacg ccaagaccaa gcccagagag 900
gagcagtaca acagcaccta cagggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 960
ctgaacggca aggaatacaa gtgcaaggtc tccaacaagg ccctgccagc ccccatcgaa 1020
aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca cgggagcccc aggtgtacac cctgcccccc 1080
tccccggagg agatgaccaa gaaccaggtg tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac 1140
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc 1200
acccccccag tgctggacag cgacggcagc ttcttcctgt acagcaagct gaccgtggac 1260
aagtcagggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgcagcg tgatgcacga agcgtgcac 1320
aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tcccccgga agggcggtc cggcggaagc 1380
gatatcgtgc tgacacagag ccctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 1440
ctgagctgcc gggccagcca gttcatcggc tcccgctacc tggcctgta tcagcagaag 1500
cccgacagag ctcccagact gctgatctac ggcgccagca acagagctac cggcgtgccc 1560
gccagatttt ctggcagcgg cagcggcacc gacttcacc tgaccatcag cagcctggaa 1620
cccagagttt tcgccaccta ctactgccag cagtactacg actacccca gaccttcggc 1680
cagggcacca aggtggagat caagggcgga ggcggatccg ggggtggcgg aagtggaggc 1740
ggaggaagcg gaggggggcg aagccaggtg caattgaaag agtccggccc tgccctgggtg 1800
aagcctaccc agaccctgac cctgacatgc acctcagcg gcttcagcct gagcaacaga 1860
ggcgccggag tgggctggat cagacagcct cccggcaagg ccctggaatg gctggcctgg 1920
atcgactggg acgacgacaa gagctacagc accagcctga aaaccggct gaccatctcc 1980
aaggacacca gcaagaacca ggtggtgctc accatgacca acatgaccgc cgtggacacc 2040
gccacattt attgcgccg gatgcatctg cccctggtgt tcgatagctg gggccagggg 2100
accctggtga cagtgtccag c

```

<210> 177

5 <211> 464

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 177

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg
20     25     30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35     40     45
Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50     55     60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65     70     75     80
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro
85     90     95
Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100    105    110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
115    120    125
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
130    135    140
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Arg
145    150    155    160
Gly Gly Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
165    170    175
Trp Leu Ala Trp Ile Asp Trp Asp Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ser
180    185    190
Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
195    200    205
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
210    215    220
Cys Ala Arg Met His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
225    230    235    240

```

```

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

```

<210> 178

5 <211> 1392

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 178

```

gatatcgtgc tgacacagag ccctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
ctgagctgcc gggccagcca gtatcatcggc tcccgtctacc tggcctggta tcagcagaag 120
cccggacagg ctcccagact gctgatctac ggccgacgca acagagctac cggcgtgccc 180
gccagatttt ctggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggaa 240
cccgaggact tcgccaccta ctactgccag cagtactacg actaccccca gaccttcggc 300
cagggcacca agtgaggat caagggcgga ggcggatccg ggggtggcgg aagtggaggc 360
ggaggaagcg gagggggcgg aagccaggtg caattgaaag agtccggccc tgccctggtg 420
aagcctacc agaccctgac cctgacatgc accttcagcg gcttcagcct gagcaacaga 480
ggcggcggag tgggctggat cagacagcct cccggcaagg ccctggaatg gctggcctgg 540
atcgactggg acgacgacaa gagctacagc accagcctga aaaccggcct gacctctcc 600
aaggacacca gcaagaacca ggtggtgctc accatgacca acatggaccc cgtggacacc 660
gccacctatt attgcgcccg gatgcatctg cccctggtgt tcgatagctg gggccaggga 720
accctggtga cagtgtccag cggcggctcc ggccggaagcg acatcgagct gaccagccc 780
ccttctgtgt ctgtggcgcc cgggcagacc gccagaatca gctgcagcgg cgacagcctg 840
cggaacaagg tgtactggta tcagcagaag cccggccagg ctcccgtgct ggtgatctac 900
aagaacaacc ggcccagcgg catccctgag cggttcagcg gcagcaacag cggcaatacc 960
gccaccctga ccatcagcgg caccagggcc gaagatgagg ccgactacta ctgccagagc 1020
tacgacggcc agaaaagcct ggtgttcggc ggaggcacca agcttaccgt gctgggccag 1080
cccaaagccg ccctagcgt gaccctgttc cccccagca gcgaggaact gcaggccaac 1140
aaggccaccc tggctgcct gatcagcgac ttctaccctg gcgccgtgac cgtggcctgg 1200
aaggccgaca gcagccccgt gaaggccggc gtggagacaa ccacccccag caagcagagc 1260
aacaacaagt acgcccgcag cagctacctg agcctgaccc ccgagcagtg gaagagccac 1320
agaagctaca gctgccaggt caccacagag ggcagcaccg tggagaaaac cgtggccccc 1380
accgagtga gc 1392

```

15 <210> 179

<211> 124

<212> PRT

20

ES 2 659 406 T3

<213> Homo Sapien

<400> 179

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

<210> 180

<211> 372

<212> ADN

<213> Homo Sapien

<400> 180

caggtgcaat	tggtcgagtc	tggcggagga	ctggtgcagc	ctggtggcag	cctgagactg	60
agctgcgcgc	ccagcggcct	caccttcagc	gactacgtga	tcaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggaaagg	gcctggaatg	ggtgtccggc	atctcttggt	ctggcgtgaa	caccactac	180
gccgacagcg	tgaagggccg	gttcaccatc	agccgggaca	acagcaagaa	caccctgtac	240
ctgcagatga	acagcctgag	agccgaggac	accgccgtgt	actactgtgc	cagactgggc	300
gccaccgccca	acaacatccg	gtacaagtcc	atggacgtgt	ggggccaggg	cacactggtg	360
accgtcagct	ca					372

<210> 181

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 181

ES 2 659 406 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

- 5 <210> 182
- <211> 1362
- <212> ADN
- 10 <213> Homo Sapien
- <400> 182

```

caggtgcaat tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggtggcag cctgagactg 60
agctgcgccg ccagcggcctt cacccttcagc gactacgtga tcaactgggt gcgacaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgtccggc atctcttggt ctggcgtgaa caccactac 180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagactgggc 300
gccaccgcca acaacatccg gtacaagttc atggacgtgt ggggccaggg cacactggtg 360
accgtcagct cagctagcac caagggcccc agcgtgttcc ccctggcccc cagcagcaag 420
agcaccagcg gcggcacagc cgccctgggc tgccctggtga aggactactt ccccagagcc 480
gtgaccgtgt cctggaacag cggagccctg acctccggcg tgcacacctt ccccgccgtg 540
ctgcagagca gcggcctgta cagcctgtcc agcgtggtga cagtgccag cagcagcctg 600
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
agagtggagc ccaagagctg cgacaagacc cacacctgcc cccctgccc agcccagag 720
gcagcgggcg gaccctccgt gttcctgttc cccccaagc ccaaggacac cctgatgatc 780
agcaggaccc ccgaggtgac ctgctggtg gtggacgtga gccacgagga cccagagggtg 840
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag 900
gagcagtaca acagcaccta cagggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 960
ctgaacggca aggaatacaa gtgcaaggtc tccaacaagg ccctgccagc ccccatcgaa 1020
aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca cgggagcccc aggtgtacac cctgcccccc 1080
tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtg tcctgacct gtctggtgaa gggcttctac 1140
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc 1200
acccccccag tgctggacag cgacggcagc ttcttcctgt acagcaagct gaccgtggac 1260
aagtcagggt ggcagcagg caacgtgttc agctgcagcg tgatgcacga ggccttcgac 1320
aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tccccggca ag 1362

```

<210> 183

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 183

```

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

```

15 <210> 184

<211> 324

<212> ADN

20

<213> Homo Sapien

<400> 184

```

gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60
ctgagctgca gagcgagcca gtttattggt tctcgttatc tggcttggtg ccagcagaaa 120
ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggtgcttcta atcgtgcaac tgggggtccc 180
gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
cctgaagact ttgcgactta ttattgccag cagtattatg attatcctca gacctttggc 300
cagggtagca aagttgaaat taaa 324

```

25

<210> 185

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo Sapien

5

<400> 185

```

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

```

10

<210> 186

<211> 645

15

<212> ADN

<213> Homo Sapien

20

<400> 186

```

gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60
ctgagctgca gagcgagcca gtttattggt tctcgttatc tggcttggtta ccagcagaaa 120
ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggtgcttcta atcgtgcaac tgggggtccc 180
gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
cctgaagact ttgcgactta ttattgccag cagtattatg attatcctca gacctttggc 300
cagggtacga aagttgaaat taaacgtacg gtggccgctc ccagcgtggt catcttccc 360
cccagcgacg agcagctgaa gagcggcacc gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc 420
tacccccggg aggccaaagt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagag cggcaacagc 480
caggagagcg tcaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccctg 540
accctgagca aggccgacta cgagaagcat aaggtgtacg cctgcgaggt gacccaccag 600
ggcctgtcca gccccgtgac caagagcttc aacaggggag agtgc 645

```

<210> 187

25

<211> 699

<212> PRT

30

<213> Homo Sapien

<400> 187

ES 2 659 406 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asn	Arg
			20					25					30		
Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	Trp	Ile	Asp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser
50					55						60				
Leu	Lys	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75				80	
Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
			85						90					95	
Cys	Ala	Arg	Met	His	Leu	Pro	Leu	Val	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
130						135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150				155						160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
			165						170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
210						215						220			
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			245						250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn

ES 2 659 406 T3

275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val	
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly		
450	455	460
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser		
465	470	475
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro		
485	490	495
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Asn		
500	505	510
Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp		
515	520	525
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu		
530	535	540
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn		
545	550	555
Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
565	570	575
Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
580	585	590
Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro		
595	600	605
Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Asn Lys		
610	615	620
Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile		
625	630	635
Tyr Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
645	650	655
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu		
660	665	670
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly Gln Lys Ser Leu		
675	680	685
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
690	695	

<210> 188

5 <211> 2097

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 188

caggtgcaat tgaagaaag cggcccggcc ctggtgaaac cgacccaaac cctgaccctg 60
acctgtacct ttccggatt tagcctgtct aatcgtggtg gtggtgtggg ttggattcgc 120
cagccgcctg ggaaagccct cgagtggctg gcttggatcg attgggatga tgataagtct 180
tatagcacca gcctgaaaac gcgtctgacc attagcaaaag atacttcgaa aaatcaggtg 240

```

gtgctgacta tgaccaacat ggaccggtg gatacggcca cctattattg cgcgcgtatg 300
catcttcctc ttgtttttga ttcttggggc caaggcaccg tgggtgacggt tagctcagct 360
agcaccaagg gccccagcgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480
aacagcggag ccctgacctc cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtacagcc tgtccagcgt ggtgacagt cccagcagca gcctgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaaccacaa gccagcaac accaaggtgg acaagagagt ggagcccaag 660
agctgcgaca agaccacac ctgccccccc tgcccagccc cagaggcagc gggcggaccc 720
tccgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagcag gacccccgag 780
gtgacctgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaggaccagc aggtgaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaa accaagccca gagaggagca gtacaacagc 900
acctacaggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgaccagc actggctgaa cggcaaggaa 960
tacaagtgca aggtctccaa caaggccctg ccagccccca tcgaaaagac catcagcaag 1020
gccaagggcc agccacggga gcccaggtg tacaccctgc cccctctccg ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc cccagtgtgt 1200
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagtc caggtggcag 1260
cagggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaagcgc tgcacaacca ctacaccag 1320
aagagcctga gcctgtcccc cggcaagggc ggctccggcg gaagccaggt tcaattggtt 1380
gaaagcgggt gtgggtcgtg tcagcctggt ggtagcctgc gtctgagctg tgcagcaagc 1440
ggttttacct ttagcgatta tgtgattaat tgggttcgtc aggcaccggg taaaggtctg 1500
gaatgggtta gcggtattag ctggtcaggt gttaataccc attatgcaga tagcgtgaaa 1560
ggtcgtttta ccattagccg tgataatagc aaaaataccc tgtatctgca gatgaatagc 1620
ctgcgtgcag aagataccgc agtttattat tgtgcacgtc tgggtgcaac cgcaaataat 1680
attcgtcata aatttatgga tgtgtggggt cagggtacac tagttaccgt tagcagtgg 1740
ggtgtgggta gcggtgggtg cggatctggt ggcggtggca gtgatatcga actgaccag 1800
cctccgagcg ttagcggtgc accgggtcag accgcacgta ttagctgtag cgggtgatag 1860
ctgcgttaata aagtttatgt gtatcagcag aaaccgggtc aggcctccgt tctggttatt 1920
tataaaaata atcgtccgag cggatttccg gaacgtttta gcggtagcaa tagcgttaat 1980
accgcaaccc tgaccattag cggcaccagc gcagaagatg aagccgatta ttattgtcag 2040
agctatgatg gtcagaaaag cctggttttt ggtggtggca ccaagcttac cgttctg 2097

```

<210> 189

5 <211> 704

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 189

```

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

```

210	215	220
Thr His Thr Cys Pro	Pro Cys Pro Ala Pro	Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met Ile Ser
	245	250
Arg Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val Val	Asp Val Ser His Glu Asp
	260	265
Pro Glu Val Lys Phe	Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val Glu Val His Asn
	275	280
Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln Tyr	Asn Ser Thr Tyr Arg Val
	290	295
Val Ser Val Leu Thr	Val Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro Ile Glu Lys
	325	330
Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val Tyr Thr
	340	345
Leu Pro Pro Ser Arg	Glu Glu Met Thr Lys	Asn Gln Val Ser Leu Thr
	355	360
Cys Leu Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu Trp Glu
	370	375
Ser Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro Val Leu
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser	Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val Asp Lys
	405	410
Ser Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met His Glu
	420	425
Ala Leu His Asn His	Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser Pro Gly
	435	440
Lys Gly Gly Ser Gly	Gly Ser Gln Val Gln	Leu Val Glu Ser Gly Gly
	450	455
Gly Leu Val Gln Pro	Gly Gly Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala Ser
465	470	475
Gly Phe Thr Phe Ser	Asp Tyr Val Ile Asn	Trp Val Arg Gln Ala Pro
	485	490
Gly Lys Gly Leu Glu	Trp Val Ser Gly Ile	Ser Trp Ser Gly Val Asn
	500	505
Thr His Tyr Ala Asp	Ser Val Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg Asp
	515	520
Asn Ser Lys Asn Thr	Leu Tyr Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala Glu
	530	535
Asp Thr Ala Val Tyr	Tyr Cys Ala Arg Leu	Gly Ala Thr Ala Asn Asn
545	550	555
Ile Arg Tyr Lys Phe	Met Asp Val Trp Gly	Gln Gly Thr Leu Val Thr
	565	570
Val Ser Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly Gly
	580	585
Gly Ser Gly Gly Gly	Ser Asp Ile Glu Leu	Thr Gln Pro Pro Ser
	595	600
Val Ser Val Ala Pro	Gly Gln Thr Ala Arg	Ile Ser Cys Ser Gly Asp
	610	615
Ser Leu Arg Asn Lys	Val Tyr Trp Tyr Gln	Gln Lys Pro Gly Gln Ala
625	630	635
Pro Val Leu Val Ile	Tyr Lys Asn Asn Arg	Pro Ser Gly Ile Pro Glu
	645	650
Arg Phe Ser Gly Ser	Asn Ser Gly Asn Thr	Ala Thr Leu Thr Ile Ser
	660	665
Gly Thr Gln Ala Glu	Asp Glu Ala Asp Tyr	Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp
	675	680
Gly Gln Lys Ser Leu	Val Phe Gly Gly Gly	Thr Lys Leu Thr Val Leu
	690	695
		700

<210> 190

5 <211> 2112

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 190

```

cagggtgcaat tgaagaaaag cggcccgccc ctggtgaaac cgacccaaac cctgaccctg 60
acctgtacct tttccggatt tagcctgtct aatcgtggtg gtggtgtggg ttggattcgc 120
cagccgcctg ggaagccctt cgagtggtcg gcttggtatcg attgggatga tgataagtct 180
tatagcacca gcctgaaaac gcgtctgacc attagcaaaag atacttcgaa aaatcaggtg 240
gtgctgacta tgaccaacat ggacccggtg gatacggcca cctattattg cgcggtatg 300
catcttcctc ttgtttttga ttcttggggc caaggcaccc tgggtgacggt tagctcagct 360
agcaccaagg gccccagcgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480
aacagcggag ccctgacctc cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtacagcc tgtccagcgt ggtgacagtg cccagcagca gcctgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt ggagcccaag 660
agctgcgaca agaccacac ctgccccccc tgcccagccc cagaggcagc gggcggaccc 720
tccgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagcag gacccccgag 780
gtgacctgcg tgggtggtga cgtgagccac gaggaccacg aggtgaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaaag accaagccca gagaggagca gtacaacagc 900
acctacaggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 960
tacaagtgca aggtctccaa caaggccctg ccagccccca tcgaaaagac catcagcaag 1020
gccaagggcc agccacggga gccccaggtg tacaccctgc cccctctccg ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccagag aacaactaca agaccacccc cccagtgtg 1200
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagtc caggtggcag 1260
cagggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaagcgc tgcacaacca ctacaccag 1320
aagagcctga gcctgtcccc cggcaagggc ggctccggcg gaagccaggt tcaattggtt 1380
gaaagcggtg gtggtctggt tcagcctggt ggtagcctgc gtctgagctg tgcagcaagc 1440
gggtttacct ttagcgatta tgtgattaat tgggttcgtc aggcaccggg taaaggtctg 1500
gaatgggtta gcggtattag ctggtcaggt gtttaataccc attatgcaga tagcgtgaaa 1560
ggtcgtttta ccattagccg tgataatagc aaaaataccc tgtatctgca gatgaatagc 1620
ctgcgtgcag aagataccgc agtttattat tgtgcacgtc tgggtgcaac cgcaaataat 1680
attcgttata aatttatgga tgtgtgggtg caggttacac tagttaccgt tagcagtggt 1740
ggtggtggtg gcggtggtgg cggatctggt ggcggtggtt caggtggtgg tggcagtgat 1800
atcgaactga ccagcctcc gagcgttagc gttgcaccgg gtcagaccgc acgtattagc 1860
tgtagcggtg atagtctgcg taataaagtt tattggtatc agcagaaacc gggtcaggct 1920
ccggttctgg ttatttataa aaataatcgt ccgagcggtg ttccggaacg ttttagcgg 1980
agcaatagcg gtaataccgc aaccctgacc attagcggca cccaggcaga agatgaagcc 2040
gattattatt gtcagagcta tgatggtcag aaaagcctgg tttttggtgg tggcaccaag 2100
cttaccgttc tg 2112

```

<210> 191

5 <211> 105

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 191

```

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

```

15 <210> 192

<211> 315

<212> ADN

20

<213> Homo Sapien

<400> 192

```
gacatcgagc tgactcagcc ccctagcgtg tcagtggctc ctggccagac cgctagaatt 60
agctgtagcg gcgatagcct gcgtaacaag gtctactggg atcagcagaa gcccggccag 120
gcccctgtgc tggatcatcta taagaacaat aggcctagcg gcatccccga gcggttttagc 180
ggctctaata gcggcaacac cgctaccctg actattagcg gcactcagcg cgaggacgag 240
gccgactact actgtcagtc ctacgacggc cagaagtcac tggctcttgg cggcggaact 300
aagctgaccg tgctg                                     315
```

5 <210> 193

<211> 211

<212> PRT

10

<213> Homo Sapien

<400> 193

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

15

<210> 194

<211> 633

20

<212> ADN

<213> Homo Sapien

25 <400> 194

```
gacatcgagc tgactcagcc ccctagcgtg tcagtggctc ctggccagac cgctagaatt 60
agctgtagcg gcgatagcct gcgtaacaag gtctactggg atcagcagaa gcccggccag 120
gcccctgtgc tggatcatcta taagaacaat aggcctagcg gcatccccga gcggttttagc 180
ggctctaata gcggcaacac cgctaccctg actattagcg gcactcagcg cgaggacgag 240
gccgactact actgtcagtc ctacgacggc cagaagtcac tggctcttgg cggcggaact 300
aagctgaccg tgctgggaca gcctaaggct gccccagcg tgaccctgtt cccccccagc 360
agcaggagcg tgcaggccaa caaggccacc ctgggtgtgcc tgatcagcga cttctacca 420
ggcgccgtga ccgtggcctg gaaggccgac agcagccccg tgaaggccgg cgtggagacc 480
accaccccc gcaagcagag caacaacaag tacgcccga gcagctacct gagcctgacc 540
cccagacagt ggaagagcca caggtcctac agctgccagg tgaccacga gggcagcacc 600
gtggaaaaga ccgtggcccc aaccgagtgc agc                                     633
```

<210> 195

<211> 707

5 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 195

10

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20      25      30
Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Arg Leu Gly Ala Thr Ala Asn Asn Ile Arg Tyr Lys Phe Met Asp
 100      105      110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115      120      125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130      135      140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145      150      155      160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165      170      175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180      185      190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195      200      205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 210      215      220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225      230      235      240
Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245      250      255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260      265      270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275      280      285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290      295      300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305      310      315      320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325      330      335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340      345      350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355      360      365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370      375      380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385      390      395      400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405      410      415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420      425      430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435      440      445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu
 450      455      460
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr

```

465 470 475 480
 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr Leu Ala Trp
 485 490 495
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
 500 505 510
 Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 515 520 525
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe
 530 535 540
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Gln Thr Phe Gly
 545 550 555 560
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 565 570 575
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
 580 585 590
 Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu
 595 600 605
 Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Arg Gly Gly Val
 610 615 620
 Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Trp
 625 630 635 640
 Ile Asp Trp Asp Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Thr Arg
 645 650 655
 Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met
 660 665 670
 Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met
 675 680 685
 His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 690 695 700
 Val Ser Ser
 705

<210> 196

5 <211> 2121

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 196

cagggtgcagc tgggtggaatc aggcggagga ctggtccagc ctggcggatc acttagactg 60
 agctgtgccg ctagtggcct cacctttagc gactatgtga ttaactgggt cgcacaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtgtcaggc attagtgtga gcggcgtgaa cactcactac 180
 gccgatatcg tgaaggcccg gttcactatt agccgggata actctaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga atagcctgag agccgaggac accgccgtct actactgcgc tagactgggc 300
 gctaccgcta acaacatccg ctataagttc atggacgtgt ggggccaggg caccctgggtc 360
 acagtgtcct cagctagcac taagggccccc tcagtgttcc ccctggcccc tagctctaag 420
 tctactagcg gtggcaccgc cgctctgggc tgcctgggtca aggactactt ccccgagccc 480
 gtgaccgtgt cttggaatag cggcgctctg actagcggag tgcacacctt ccccgccgtg 540
 ctgcagtcta gcggcctgta tagcctgtct agcgtcgtga ccgtgcctag ctctagcctg 600
 ggactcaga cctatatctg taacgtgaac cacaagccta gtaacactaa ggtggacaag 660
 cgggtggaac ctaagtcttg cgataagact cacacctgtc cccctgccc tgcccagaa 720
 gctgctggcg gacctagcgt gttcctgttc ccacctaagc cttaaagacac cctgatgatt 780
 agtaggaccc ccgaagtgc ctgcgtggtg gtggacgtca gccacgagga ccctgaagtg 840
 aagttcaatt ggtatgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ctaagactaa gcctagagag 900
 gaacagtata actccaccta tagggtggtg tcagtgtgta ccgtgctgca ccaggactgg 960
 ctgaaccgga aagagtataa gtgtaaagtc tctaacaagg ccctgcctgc ccctatcgaa 1020
 aagactatct ctaaggctaa gggccagcct agagaacccc aggtctacac cctgccccct 1080
 agtagagaag agatgactaa gaatcaggtg tccctgacct gtctggtcaa gggcttctac 1140
 cctagcgata tcgccgtgga gtgggagtc aaaggccagc ccgagaacaa ctataagact 1200
 acccccctg tgctggatag cgacggctct ttcttcctgt actctaaact gaccgtggac 1260
 aagtctaggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgtagcg tgatgcacga ggcctgcac 1320
 aatcactaca ctcagaagtc actgagcctg agtcccggca agggcggtc aggcggtagc 1380
 gatatcgtgc tgactcagtc acccgctacc ctgagtcgta gccctggcga gcgggctaca 1440
 ctgagctgta gagctagtca gtttatcggc tcacgctacc tggcctggtg tcagcagaag 1500
 cccggccagg ccctagact gctgatctac ggcgctagta atagagctac cggcgtgccc 1560

ES 2 659 406 T3

```

gctaggttta gcggtcagc atcaggcacc gactttaccc tgactattag tagcctggaa 1620
cccgaggact tcgctaccta ctactgtcag cagtactacg actaccctca gaccttcggc 1680
cagggaacta aggtcgagat taagggcggt ggcggtagcg gcggaggcgg atcagggtggt 1740
ggtggtagtg gcggcggagg tagtcaggtc cagctgaaag agtcaggccc tgccctgggtc 1800
aagcctactc agaccctgac cctgacctgc acttttagcg gcttttagcct gagtaataga 1860
ggcggcggag tgggtcggat tagacagcct ccaggcaaag ccctggagtg gctggcctgg 1920
atcgactggg acgacgataa gtcctactcc actagcctga aaactaggct gacaatcagc 1980
aaggacacta gtaaaaacca ggtggtgctg actatgacta atatggaccg cgtggacacc 2040
gctacctatt attgcgctag aatgcacctc ccactggtgt tcgatagctg gggtcaggga 2100
actctggtca cagtcagtag c 2121

```

<210> 197

5 <211> 105

<212> PRT

<213> Homo Sapien

10

<400> 197

```

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

```

15 <210> 198

<211> 315

<212> ADN

20

<213> Homo Sapien

<400> 198

```

tcttacgagc tgaccagacc cccttcctgt tctgtggctc ctggccagac cgccagaatc 60
tcttgctccg gcgactccct gcggaacaag gtgtactggt atcagcagaa gcccggccag 120
gcccctgtgc tggatcatcta caagaacaac cggccctccg gcatccccga gagattctct 180
ggctccaact ccggcaacac cgccaccctg acaatctctg gcacacaggc cgaggacgag 240
gccgactact actgccagtc ctacgacggc cagaaatcac tgggtgttcg cggaggcacc 300
25 aagctgacag tgctg 315

```

<210> 199

<211> 211

30

<212> PRT

<213> Homo Sapien

35 <400> 199

ES 2 659 406 T3

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

100 105 110
 Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
 115 120 125
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
 130 135 140
 Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
 165 170 175
 Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys
 180 185 190
 Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
 195 200 205
 Glu Cys Ser
 210

5 <210> 200

<211> 633

<212> ADN

10 <213> Homo Sapien

<400> 200

tcttacgagc tgaccagacc cccttccgtg tctgtggctc ctggccagac cgccagaatc 60
 tcttgctccg gcgactccct gcggaacaag gtgtactggg atcagcagaa gcccggccag 120
 gccctgtgc tggatcatcta caagaacaac cggccctccg gcatccccga gagattctct 180
 ggctccaact ccggcaacac cgccaccctg acaatctctg gcacacaggc cgaggacgag 240
 gccgactact actgccagtc ctacgacggc cagaaatcac tgggtgttcgg cgagagcacc 300
 aagctgacag tgctgggaca gcctaaggct gccccagcg tgaccctgtt cccccccagc 360
 agcgaggagc tgcaggccaa caaggccacc ctggtgtgcc tgatcagcga cttctacca 420
 ggcgcccgtga ccgtggcctg gaaggccgac agcagcccg tgaaggccgg cgtggagacc 480
 accacccccca gcaagcagag caacaacaag tacgccgcca gcagctacct gacgctgacc 540
 cccgagcagt ggaagagcca caggtcctac agctgccagg tgaccacga gggcagcacc 600
 15 gtggaaaaga ccgtggcccc aaccgagtgc agc 633

<210> 201

<211> 707

20 <212> PRT

<213> Homo Sapien

25 <400> 201

ES 2 659 406 T3

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu
450 455 460
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
465 470 475 480
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr Leu Ala Trp
485 490 495
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
500 505 510
Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
515 520 525
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe
530 535 540
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Gln Thr Phe Gly
545 550 555 560
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
565 570 575
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
580 585 590
Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu
595 600 605
Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Arg Gly Gly Gly Val
610 615 620
Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Trp
625 630 635 640
Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Thr Arg
645 650 655
Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met
660 665 670
Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met
675 680 685
His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
690 695 700
Val Ser Ser

705

5 <210> 202

<211> 2121

<212> ADN

10

<213> Homo Sapien

<400> 202

```

caggtgcagc tgggtggaatc aggcggagga ctggtccagc ctggcggatc acttagactg 60
agctgtgccg ctagtggcctt cacctttagc gactatgtga ttaactgggt cgcacaggcc 120
cctggcaagg gactggaatg ggtgtcaggc attagttgga gcggcgtgaa cactcactac 180
gccgatagcg tgaagggccg gttcactatt agccgggata actctaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga atagcctgag agccgaggac accgccgtct actactgcgc tagactgggc 300
gctaccgcta acaacatccg ctataagttc atggacgtgt ggggccaggg caccctgggtc 360
acagtgtctt cagctagcac taagggcccc tcagtgttcc ccctggcccc tagctctaag 420
tctactagcg gtggcaccgc cgctctgggc tgccctggta aggactactt ccccgagccc 480
gtgaccgtgt cttggaatag cggcgctctg actagcggag tgcacacctt ccccgccgtg 540
ctgcagtcta gcggcctgta tagcctgtct agcgtcgtga ccgtgcctag ctctagcctg 600
ggcactcaga cctatatctg taacgtgaac cacaagccta gtaacactaa ggtggacaag 660
cgggtggaac ctaagtcttg cgataagact cacacctgtc cccctgccc tgccccagaa 720
gctgctggcg gacctagcgt gttcctgttc ccacctaaag ctaaagacac cctgatgatt 780
agtaggaccc ccgaagtgc ctgctggtg gtggacgtca gccacgagga ccctgaagtg 840
aagttcaatt ggtatgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ctaagactaa gcctagagag 900
gaacagtata actccaccta taggggtggtg tcagtgtctga ccgtgctgca ccaggactgg 960
ctgaacggca aagagtataa gtgtaagtc tctaacaagg ccctgcctgc ccctatcgaa 1020
aagactatct ctaaggctaa gggccagcct agagaacccc aggtctacac cctgccccct 1080
agtagagaag agatgactaa gaatcaggtg tccctgacct gtctgggtcaa gggcttctac 1140
cctagcgata tcgccgtgga gtgggagctt aacggccagc ccgagaacaa ctataagact 1200
acccccctgt tgctggatag cgacggctct tcttctctgt actctaaact gaccgtggac 1260
aagtctaggt gcgacgagg caacgtgttc agctgtagcg tgatgcacga ggccctgcac 1320
aatcactaca ctacagaagtc actgagcctg agtcccggca agggcggctc aggcggtagc 1380
gatatcgtgc tgactcagtc acccgctacc ctgagtctga gccctggcga gcgggctaca 1440
ctgagctgta gagctagtca gtttatcggc tcacgtacc tggcctggtg tcagcagaag 1500
cccgccagg cccctagact gctgatctac ggcgctagta atagagctac cggcgtgccc 1560
gctaggttta gcggctcagg atcaggcacc gactttacc tgactattag tagcctggaa 1620
cccgaggact tcgctaccta ctactgtcag cagtactacg actaccctca gaccttcggc 1680
caggaacta agtgcagat taagggcggg ggcggtagcg gcggaggcgg atcaggtggt 1740
ggtggtagt gcggcggagg tagtcaggtc cagctgaaag agtcaggccc tgccctgggtc 1800
aagcctactc agaccctgac cctgacctgc acttttagcg gctttagcct gagtaataga 1860
ggcgcgagg tgggctggat tagacagcct ccaggcaaag ccctggagtg gctggcctgg 1920
atcgactggg acgacgataa gtcctactcc actagcctga aaactaggct gacaatcagc 1980
aaggacacta gtaaaaacca ggtggtgctg actatgacta atatggacc cgtggacacc 2040
gctacctatt attgcgctag aatgcacctc ccactggtgt tcgatagctg gggtcaggga 2100
actctggtca cagtcagtag c 2121

```

5

<210> 203

<211> 105

10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 203

15

```

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

```

100

105

20

<210> 204

<211> 315

<212> ADN

<213> Homo Sapien

5 <400> 204

```
agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtg tcagtggctc tgggccagac cgctagaatc 60
acctgtagcg gcgatagcct gagaaacaag gtctactggg atcagcagaa gcccggccag 120
gcccctgtgc tggatcatcta taagaacaat aggcctagcg gcatccccga gcggttttagc 180
ggctctaata gcggcaacac cgctaccctg actattagta gggctcaggc cggcgacgag 240
gccgactact actgtcagtc ctacgacggc cagaagtcac tggctcttgg cggcggaact 300
aagctgaccg tgctg                                     315
```

<210> 205

10 <211> 211

<212> PRT

15 <213> Homo Sapien

<400> 205

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

20 <210> 206

<211> 633

25 <212> ADN

<213> Homo Sapien

<400> 206

```
agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtg tcagtggctc tgggccagac cgctagaatc 60
acctgtagcg gcgatagcct gagaaacaag gtctactggg atcagcagaa gcccggccag 120
gcccctgtgc tggatcatcta taagaacaat aggcctagcg gcatccccga gcggttttagc 180
ggctctaata gcggcaacac cgctaccctg actattagta gggctcaggc cggcgacgag 240
gccgactact actgtcagtc ctacgacggc cagaagtcac tggctcttgg cggcggaact 300
aagctgaccg tgctgggaca gcctaaggct gcccacagcg tgaccctgtt cccccccagc 360
agcgaggagc tgcaggccaa caaggccacc ctggtgtgcc tgatcagcga cttctaccca 420
```

ggcgccgtga ccggtggcctg gaaggccgac agcagccccc tgaaggccgg cgtggagacc 480
accacccccca gcaagcagag caacaacaag tacgcccga gcagctacct gagcctgacc 540
cccagagcagt ggaagagcca caggtcctac agctgccagg tgaccacga gggcagcacc 600
gtggaaaaga ccgtggcccc aaccgagtgc agc 633

<210> 207

5

<211> 707

<212> PRT

10 <213> Homo Sapien

<400> 207

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
			20					25					30		
Val	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Ser	Gly	Val	Asn	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Leu	Gly	Ala	Thr	Ala	Asn	Asn	Ile	Arg	Tyr	Lys	Phe	Met	Asp
			100					105					110		
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115				120					125			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145					150				155					160	
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165					170					175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180					185					190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
			195				200					205			
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
	210					215					220				
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
225					230				235					240	
Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				245					250				255		
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260					265					270		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			275					280				285			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
			290			295					300				
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
305					310				315					320	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
				325					330				335		
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
			340					345					350		
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			355				360					365			
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			370			375					380				
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
385					390				395					400	
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				405					410				415		
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
			420					425					430		

15

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu
450 455 460
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
465 470 475 480
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Ser Arg Tyr Leu Ala Trp
485 490 495
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
500 505 510
Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
515 520 525
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe
530 535 540
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Gln Thr Phe Gly
545 550 555 560
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
565 570 575
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
580 585 590
Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu
595 600 605
Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Arg Gly Gly Gly Val
610 615 620
Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Trp
625 630 635 640
Ile Asp Trp Asp Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Thr Arg
645 650 655
Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met
660 665 670
Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met
675 680 685
His Leu Pro Leu Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
690 695 700
Val Ser Ser
705

<210> 208

5 <211> 2121

<212> ADN

<213> Homo Sapien

10

<400> 208

gaggtgcagc tgctggaatc aggcggagga ctggtgcagc ctggcggatc actgagactg 60
agctgtgccg ctagtggcct cacttttagc gactatgtga ttaactgggt ccgacaggcc 120
cctggcaagg gactggaatg ggtgtcaggc attagttgga gcggcgtgaa cactcactac 180
gccgatagcg tgaagggccg gttcactatt agccgggata actctaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga atagcctgag agccgaggac accgccgtct actactgcgc tagactgggc 300
gctaccgcta acaacatccg ctataagttc atggacgtgt ggggccaggg caccctggtc 360
acagtgtcct cagctagcac taagggcccc tcagtgttcc ccctggcccc tagctctaag 420
tctactagcg gtggcaccgc cgctctgggc tgctgtgtca aggactactt ccccgagccc 480
gtgaccgtgt cttggaatag cggcgctctg actagcggag tgcacacctt ccccgccgtg 540
ctgcagtcta gcggcctgta tagcctgtct agcgtcgtga ccgtgcctag ctctagcctg 600
ggcactcaga cctatatctg taacgtgaac cacaagccta gtaacactaa ggtggacaag 660
cgggtggaac ctaagtcttg cgataagact cacacctgtc cccctgccc tgccccagaa 720
gctgctggcg gacctagcgt gttcctgttc ccacctaagc cttaaagacac cctgatgatt 780
agtaggaccc ccgaagtgc ctgctgtgtg gtggacgtca gccacgagga ccctgaagtg 840
aagttcaatt ggtatgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ctaagactaa gcctagagag 900
gaacagtata actccacctg tagggtggtg tcagtgtgta ccgtgctgca ccaggactgg 960
ctgaacggca aagagtataa gtgtaaagtc tctaacaagg ccctgcctgc ccctatcgaa 1020
aagactatct ctaaggctaa gggccagcct agagaacccc aggtctacac cctgccccct 1080
agtagagaag agatgactaa gaatcaggtg tccctgacct gtctggtcaa gggcttctac 1140
cctagcgata tcgccgtgga gtgggagtc aaaggccagc ccgagaacaa ctataagact 1200
acccccctg tgctggatag cgacggctct ttcttctgt actctaaact gaccgtggac 1260

15

ES 2 659 406 T3

	aagtctaggt	ggcagcaggg	caacgtgttc	agctgtagcg	tgatgcacga	ggccctgcac	1320
	aatcactaca	ctcagaagtc	actgagcctg	agtcccggca	agggcggctc	aggcggtagc	1380
5	gatatcgtgc	tgactcagtc	acccgctacc	ctgagtctga	gccctggcga	gcgggctaca	1440
	ctgagctgta	gagctagtca	gtttatcggc	tcacgctacc	tggcctggta	tcagcagaag	1500
	cccggccagg	cccctagact	gctgatctac	ggcgctagta	atagagctac	cggcgtgccc	1560
	gctaggttta	gcggctcagg	atcaggcacc	gactttaccc	tgactattag	tagcctggaa	1620
10	cccgaggact	tcgctacct	ctactgtcag	cagtactacg	actaccctca	gaccttcggc	1680
	cagggaacta	aggtcgagat	taagggcggg	ggcggtagcg	gcggaggcgg	atcaggtggg	1740
	ggtggtagt	gcggcgagg	tagtcaggtc	cagctgaaag	agtcaggccc	tgccctgggc	1800
	aagcctactc	agaccctgac	cctgacctgc	acttttagcg	gcttttagcct	gagtaataga	1860
15	ggcggcggag	tgggctggat	tagacagcct	ccaggcaaag	ccctggagt	gctggcctgg	1920
	atcgactggg	acgacgataa	gtcctactcc	actagcctga	aaactaggct	gacaatcagc	1980
	aaggacacta	gtaaaaacca	ggtggtgctg	actatgacta	atatggaccc	cgtggacacc	2040
	gctacctatt	attgcgctag	aatgcacctc	ccactggtgt	tcgatagctg	gggtcagggg	2100
20	actctggtca	cagtcagtag	c				2121

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo frente a una proteína 6 relacionada con lipoproteínas de baja densidad (LRP6), en el que dicho anticuerpo o fragmento (i) se une a la región propulsora 1 de LRP6, (ii) inhibe específicamente la señalización de Wnt dependiente de propulsor 1 y (iii) tiene una constante de la velocidad de disociación (K_D) de menos de 5×10^{-9} M determinada usando resonancia de plasmón superficial, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 1; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4; una CDR2 de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5; y una CDR3 de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 6, en el que el anticuerpo o fragmento es monovalente o bivalente.
2. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento monoclonal.
3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento humano, humanizado o quimérico.
4. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento es un Fab, un F(ab)', un scFv o un sdFv.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada humana y una región constante de cadena ligera humana.
6. El anticuerpo o fragmento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une tanto a LRP6 humana como a LRP6 de mono cinomolgo.
7. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo es un isotipo de IgG.
8. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende un marco en el que los aminoácidos se han sustituido en la estructura del anticuerpo con respecto a las respectivas secuencias de la línea germinal VH o VL humanas.
9. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una VH que comprende la SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende la SEQ ID NO: 13.
10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada idéntica a la SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera idéntica a la SEQ ID NO: 13.
12. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11.
13. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa LRP6 en un sujeto, opcionalmente en el que el sujeto es un ser humano.
14. La composición para su uso según la reivindicación 13, en la el cáncer está mediado por una vía de señalización Wnt canónica y se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de próstata, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas y melanoma.
15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho cáncer es cáncer de mama.
16. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso como medicamento.
17. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento de un cáncer que expresa LRP6.
18. El anticuerpo o fragmento para su uso según la reivindicación 17, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de próstata, leucemia mieloide aguda, enfermedad crónica leucemia mieloide, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas y melanoma.

Fig. 1A

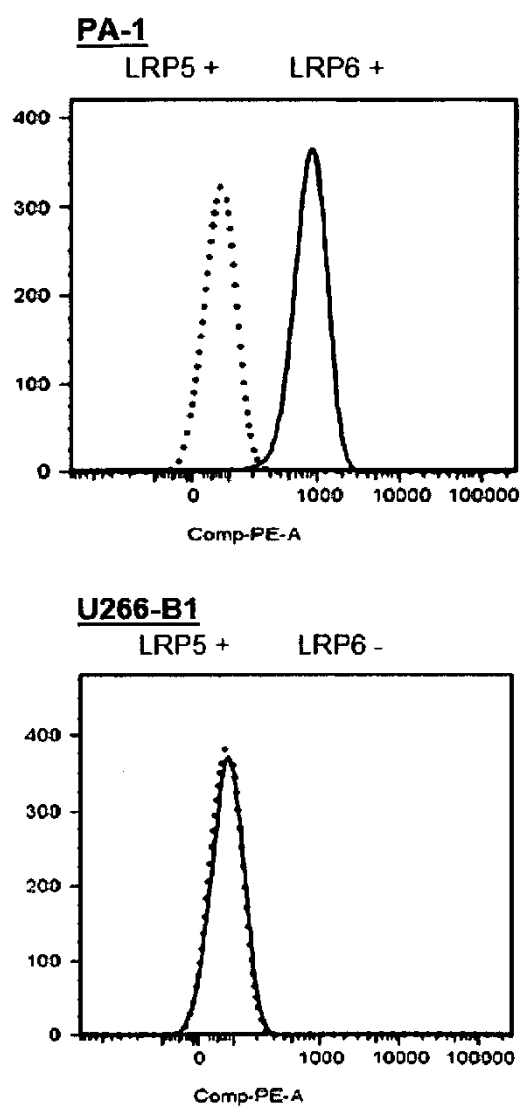
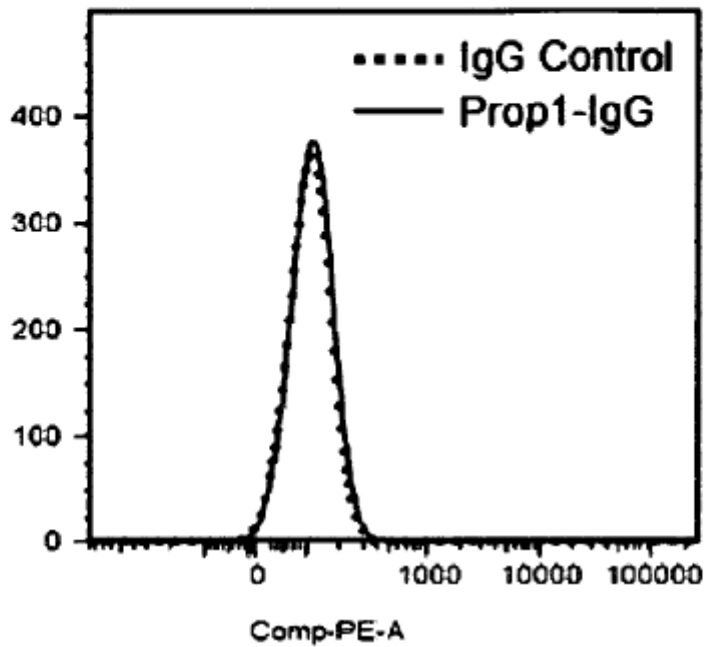


Fig. 1A continuación

Daudi

LRP5 -

LRP6 -



Expresión de ARNM
respecto a la línea celular PA1

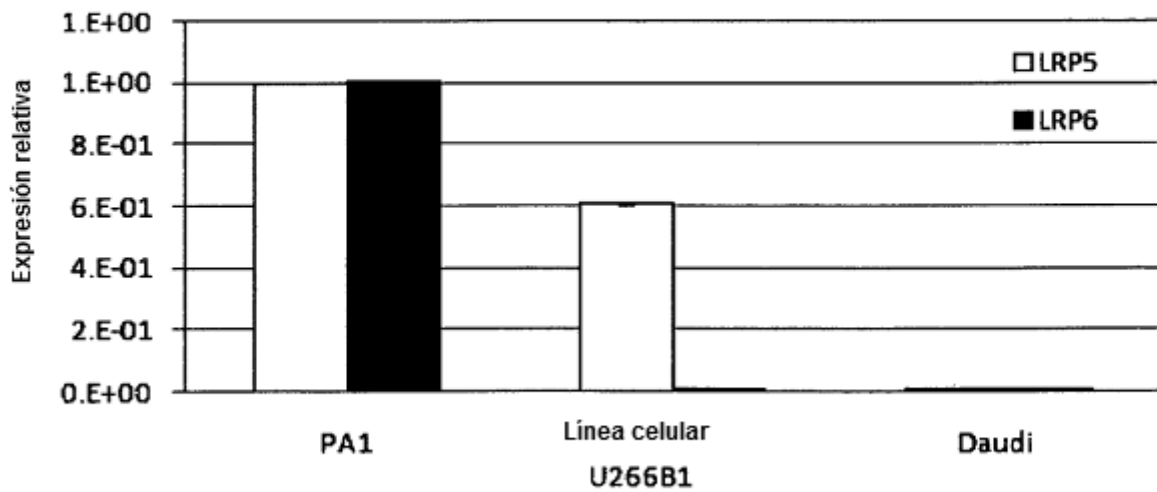


Fig. 1B

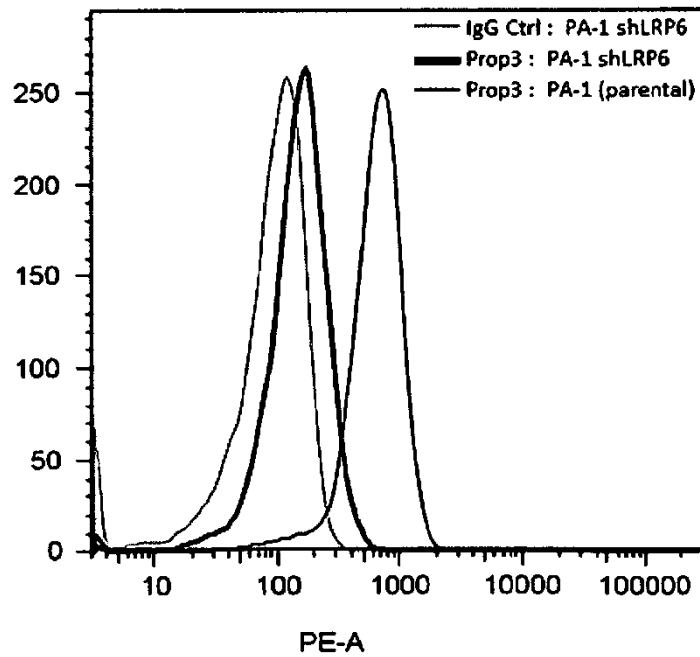
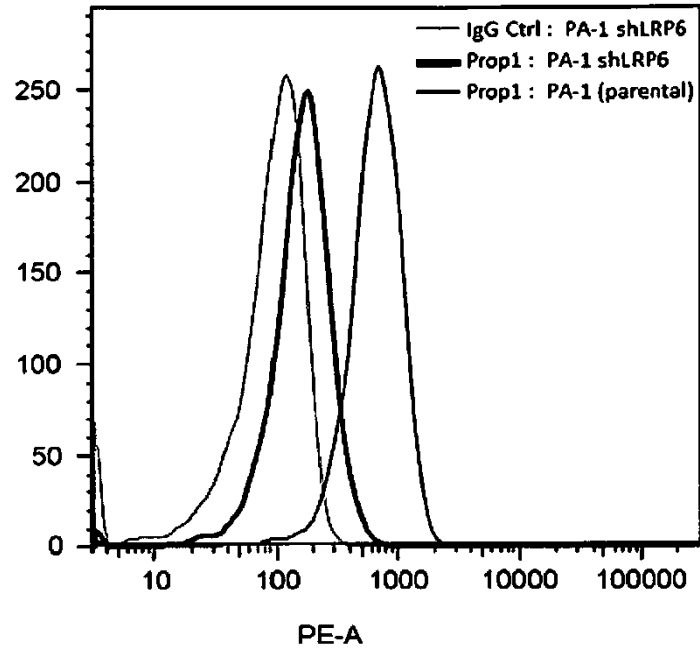


Fig. 1B continuación

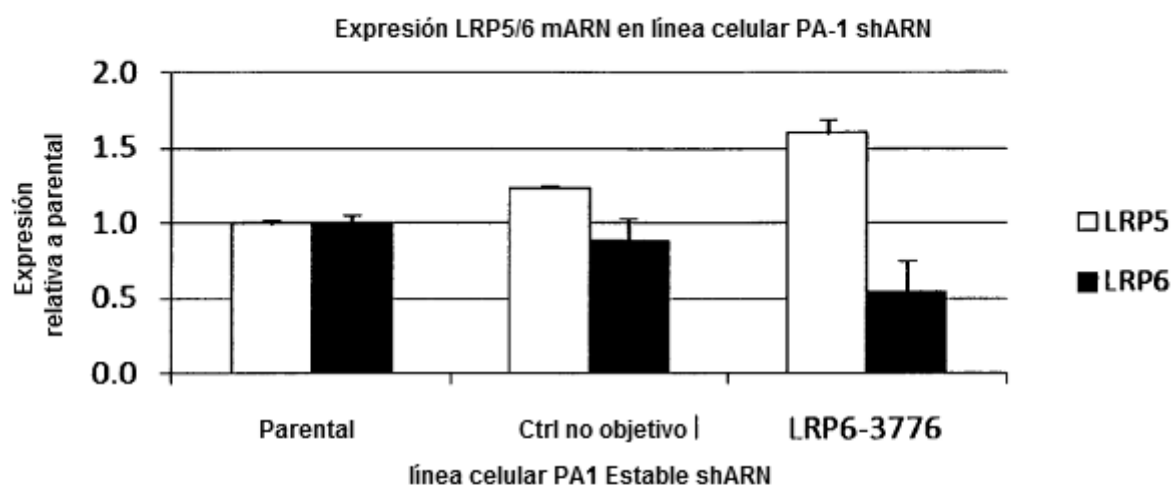


Fig. 2A

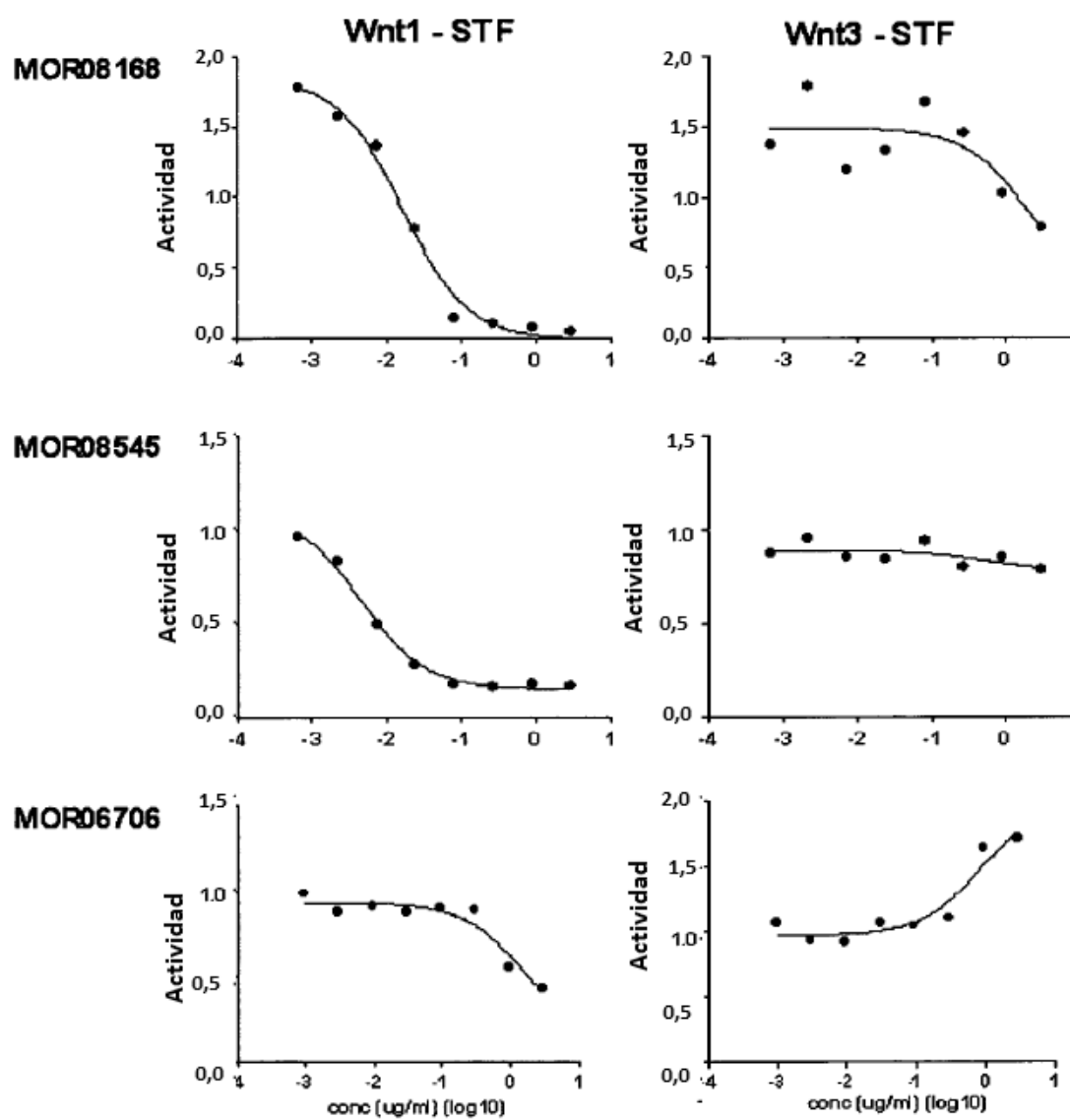


Fig. 2B

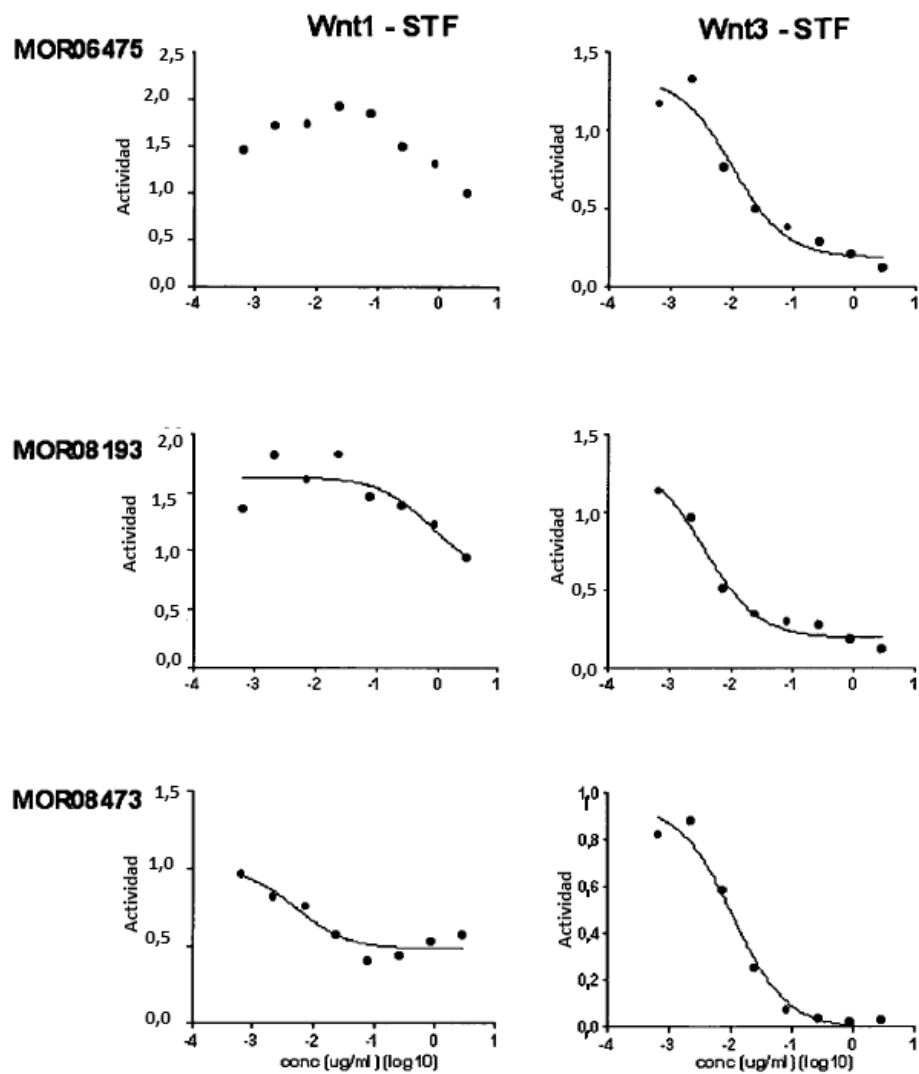


Fig. 3

	Prop 1			Prop3		
	MOR08168	MOR08545	MOR06706	MOR06475	MOR08193	MOR08473
LRP6 Humana	0,28	0,09	0,14	0,31	0,36	0,74
LRP6 de ratón	0,12	0,06	n/a	0,96	0,08	0,46
LRP6 de cínomoigo	0,88	0,30	0,46	0,22	0,20	0,52

Valores de EC₅₀ se expresen en nM

Fig. 4

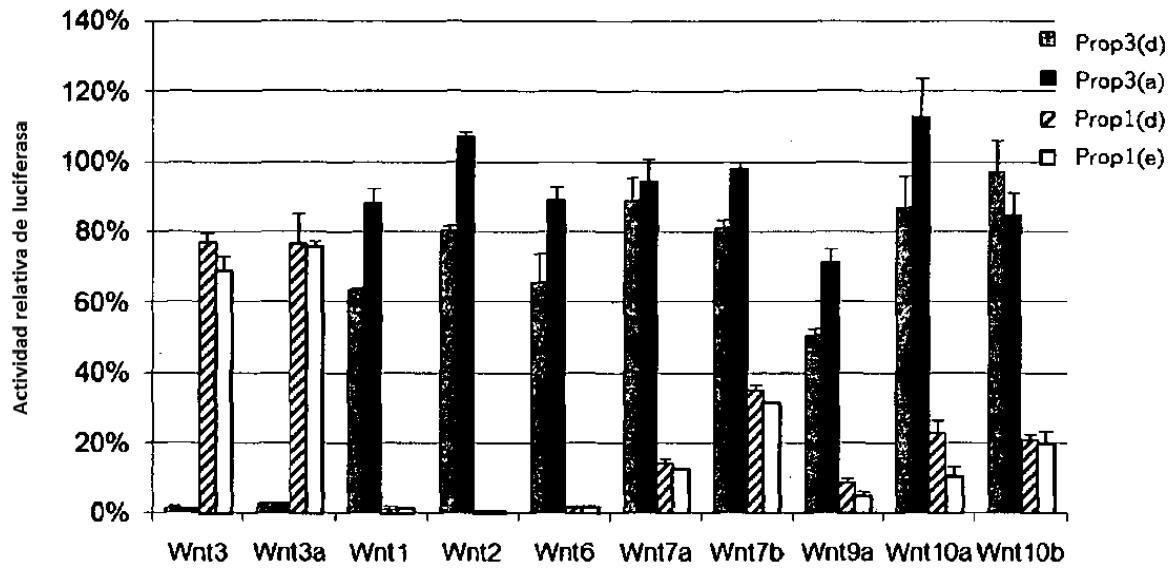


Fig. 5

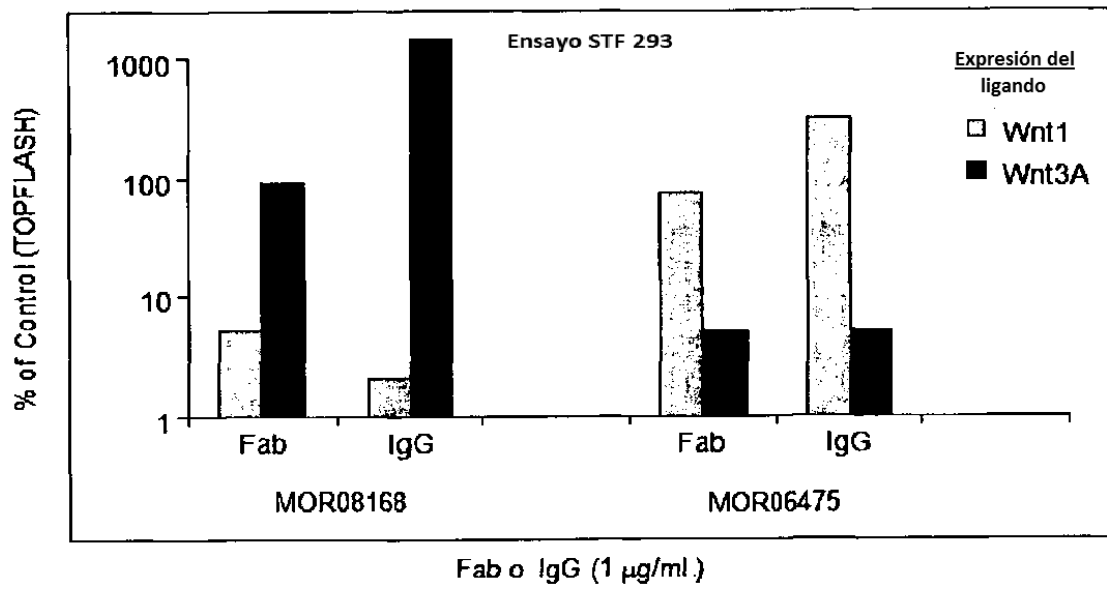


Fig. 6

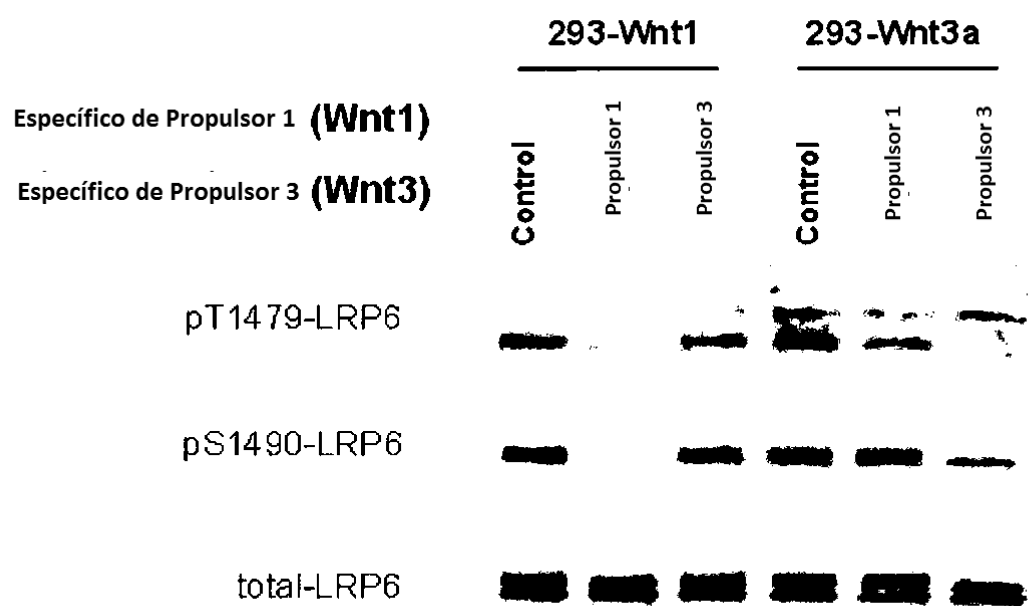
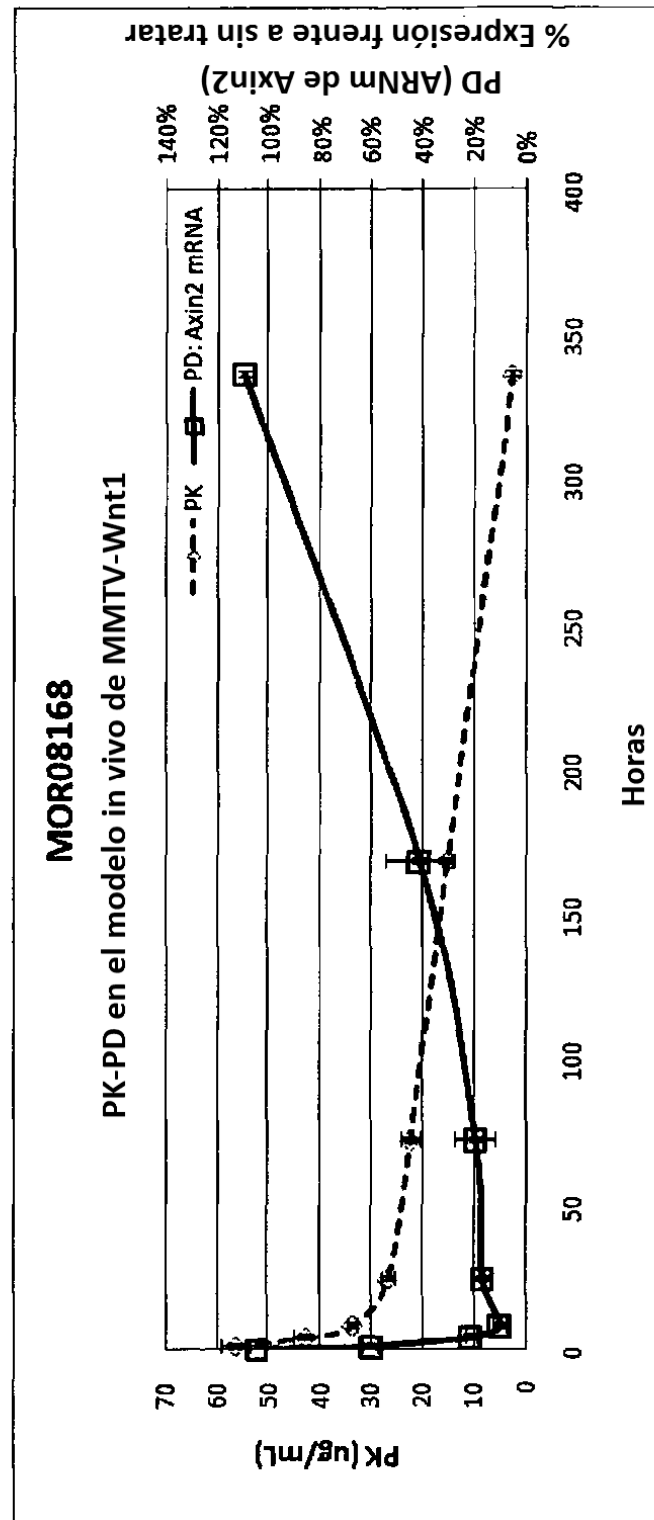


Fig. 7



Puntos de tiempo: 1, 4, 8 y 24 horas, 3, 7 y 14 días

Fig. 8A

ID de la sonda	Símbolo del gen	Título del gen	ID del gen Entrez	log(2) del cambio 0 h vs. 8 h	adj. P.Val 0 h vs. 8 h
1435154_at	AU018091	secuencia expresada	AU018091	245128	2.51 0.008168
1418743_a_at	LOC100047138 /// Tesc	similar a tescalcina /// tescalcina	100047138 /// 57816	2.42	0.000707
1418744_s_at	LOC100047138 /// Tesc	similar a tescalcina /// tescalcina	100047138 /// 57816	2.41	0.001168
1447891_at	---	---	---	2.35	0.00122
1417956_at	Cidea	factor de fragmentación de ADN inductor de muerte celular, efector A de tipo subunidad alfa	12683	2.32	0.006174
1436279_at	---	---	---	2.25	0.000742
1451139_at	Slc39a4	familia 39 del transportador de solutos (transporte cinc), miembro 4	72027	2.04	0.000336
1417130_s_at	Angptl4	de tipo angiopoietina 4	57875	1.94	0.000722
1434918_at	Sox6	gen b que contiene la caja SKY	20679	1.79	0.002107
1451612_at	Mt1	metaloionina 1	17748	1.74	0.004696
1441915_s_at	2310076L09Rik	ADNc de RIKEN gen 2310076L09	66968	1.71	0.0025
1423860_at	Prgds	prostaglandina D2 sintasa (cerebro)	19715	1.66	0.001237
1428283_at	Cyp2s1	familia 2 de citocromo P450, subfamilia s, polipeptido: 1	74134	1.64	0.004778
1439036_a_at	Atp1b1	ATPase, Na+/K+ transporting, polipeptido beta 1	11931	1.63	0.00705
1451410_a_at	Crip3	proteína 3 rica en cisteína	114570	1.62	0.000223
1459898_at	Sbsn	suprabasina	282619	1.60	0.002259
1433888_at	Atp2b2	ATPasa, transportador de Ca++, membrana plasmática	11941	1.58	0.009975
1450435_at	L1cam	molécula de adhesión celular L1	16728	1.57	0.001168

Fig. 8A continuación

ID de la sonda	Símbolo del gen	Título del gen	ID del gen Entrez	log(2) del cambio 0h vs. 8h	adj. P.Val 0h vs. 8h
1455506_at	Slc25a34	Familia 25 del transp. de solutos, miembro 34	384071	1.55	7,26E-05
1422820_at	Lipe	hormona sensible a la lipasa	16890	1.52	0,003431
1447655_x_at	Sox6	gen 6 que contiene la caja SRY	20679	1.51	0,003772
1451204_at	Scara5	clase A del receptor secuestrante, miembro 5 (putativo)	71145	1.51	0,001792
1451828_a_at	Acs4	miembro 4 de cadena larga de la familia de acil CoA	50790	1.48	6,46E-05
1451331_at	Ppp1r1b	proteína fosfatasa 1, subunidad 1B reguladora (inhibidora)	19049	1.44	0,002536
1418453_a_at	Atp1b1	ATP transp. de Na ⁺ /K ⁺ , polipéptido beta 1, polypeptide	11931	1.43	0,004956
1419706_a_at	Akap12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	83397	1.42	0,000118
1418911_s_at	Acs4	proteína de anclaje de A quinasa (PRKA) [gravina] 12 r 4	50790	1.40	0,003297
1439630_x_at	Sbsn	suprabasina	282619	1.38	0,00074
		transactivador de interacción Cbp/p300, con			
		dominio carboxi-terminal rico en Glu/Asp, 4, ARNm (clon de ADNC			
1438261_at	Cited4	IMAGE:3670674)	56222	1.36	0,006783
1429952_at	Mospd4	dominio de esperma móvil que contiene 4	72076	1.36	0,005578
1435595_at	1810011010Rik	ADNc de RIKEN, gen 1810011010	69068	1.34	0,000592
1429352_at	Mocos	sulfatasa del cofactor de molibdeno	68591	1.32	0,009036
1459897_a_at	Sbsn	suprabasina	282619	1.32	0,001447
1447845_s_at	Vnn1	vanina 1	22361	1.31	0,004465
1421841_at	Fgfr3	receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos	14184	1.29	7,26E-05
1424937_at	2310076L09Rik	ADNc de RIKEN, gen 2310076L09	66968	1.29	0,000118
1449403_at	Pde9a	fosfodiesterasa 9A e 9A	18585	1.27	0,009729
1424218_a_at	Creb3l4	proteína 3 similar a 4 de unión al elemento respondedor a AMPc	78284	1.21	0,002044

Fig. 8A continuación

ID de la sonda	Símbolo del gen	Título del gen	ID del gen Entrez	log(2) del cambio ¹ 0 h vs. 8 h	adj. P.Val ² 0 h vs. 8 h
1424763_at	Rsph9	homólogo 9 de la cabeza de la espiga radial (Chlamydomonas)	75564	1,21	0,006783
1420521_at	Papln	papilina, glicoproteína sulfatada similar a proteoglicano	170721	1,21	0,004502
1434442_at	Stbd1	dominio 1 de unión a almidón	52331	1,19	0,004723
1438033_at	Tef	factor embrionario tirotrópico	21685	1,17	0,001335
1442335_at	---	---	---	1,16	0,006174
1448227_at	Grb7	proteína 7 unida al receptor del factor de crecimiento	14786	1,14	0,001261
1416596_at	Slc44a4	familia 44 del transportador de solutos, miembro 4	70129	1,14	0,008898
1439620_at	Car13	anhidrasa carbónica 13	71934	1,13	0,00323
1418780_at	Cyp39a1	citocromo P450, familia 39, subfamilia a, polipéptido 1	56050	1,12	0,006174
1460409_at	Cpt1a	C arnitina palmitoiltransferasa 1a, hígado	12894	1,10	0,003297
1449146_at	Notch4	homólogo 4 del gen Notch (Drosophila)	18132	1,10	0,008351
1443841_x_at	Uap1l1	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa 1 similar a 1 yase 1-like 1	227620	1,08	0,00764
1417273_at	Pdk4	piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 4 lenzyme 4	27273	1,08	0,006174
1430278_a_at	Dqx1	ATPasa dependiente de ARN de DEAQ	93838	1,07	0,0025
1426065_a_at	Trib3	homólogo 3 de tribbles (Drosophila)	228775	1,04	0,002859
1438038_at	4930402H24Rik	ADNc de RIKEN gen4930402H24	228602	1,03	0,00599
1427537_at	Eppk1	epiplaquina 1	223650	1,02	0,00114
1416457_at	Ddah2	dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2	51793	1,01	0,005738

Fig. 8B

ID de la sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen Entrez	log(2) cambio 0 h vs. 8 h	adj. P. Val 0 h vs. 8 h
1449451_at	Serpnb11	Inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B (ovoalbumina), miembro 11	66957	-3.95	7.37E-07
1451129_at	Calb2	calbindina 2	12308	-3.14	0.006783
1436845_at	Axin2	axina 2	12006	-2.92	4.53E-07
1416468_at	Aldh1a1	aldehído deshidrogenasa, familia 1, subfamilia A1	11668	-2.83	0.000506
1427508_at	Arsi	arilsulfatasa	545260	-2.55	0.000592
1418601_at	Aldh1a7	aldehído deshidrogenasa, familia 1, subfamilia A7	26358	-2.55	0.005578
1432592_at	Pappa	proteína A plasmática asociada al embarazo	18491	-2.55	6.46E-05
1425985_s_at	Masp1	lectina serina peptidasa 1 de unión a manano	17174	-2.48	0.001787
1434802_s_at	Ntf3	neurotrofina 3	18205	-2.43	0.000914
1425978_at	Myocd	miocardina	214384	-2.39	0.00374
1436221_at	Illdr2	receptor 2 que contiene domini similar a inmunoglobulina	100039795	-2.36	0.00296
1418678_at	Has2	hialuronano sintasa 2	15117	-2.31	0.000996
1436894_at	Illdr2	receptor 2 que contiene domini similar a inmunoglobulina	100039795	-2.3	0.0025
1427633_a_at	Pappa	proteína A plasmática asociada al embarazo	18491	-2.21	0.002187
1436293_x_at	Illdr2	receptor 2 que contiene domini similar a inmunoglobulina	100039795	-2.17	0.002799
1433959_at	Zmat4	dado de cinc, matrina de tipo 4	320158	-2.14	0.00638
1427600_at	---	---	---	-2.12	6.46E-05
1432591_at	Pappa	proteína A plasmática asociada al embarazo	18491	-2.07	0.001159

Fig. 8B continuación

ID de la sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen Entrez	log(2) cambio 0 h vs. 8 h	adj. P.Val 0 h vs. 8 h
1448397_at	Gjb6	gap junction protein, beta 6	14623	-2,06	0,002796
1449926_at	Cd70	proteína de unión a gap,	21948	-2,05	0,006174
1441807_s_at	---	---	---	-2,02	0,004956
1438602_s_at	Masp1	lectina serina peptidasa 1 de unión a manano	17174	-2,01	0,00255
1425212_a_at	Tnfrsf19	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 19	29820	-1,94	6,46E-05
1428223_at	Mfsd2	superfamilia del facilitador principal que contiene 2	76574	-1,93	0,006536
1420006_at	Bmp15	proteína morfogenética ósea 15 (Bmp15), mRNA	12155	-1,91	0,000707
1429506_at	Nkd1	homólogo 1 de cutícula desnuda (Drosophila)	93960	-1,91	0,001459
1433894_at	Jazf1	dedo de cinc 1 JAZF	231986	-1,9	0,000592
1422699_at	Alox12	araquinodato 12-lipooxigenasa 12	11684	-1,89	0,001168
1460449_at	Anks1b	repetición de anquirina y motivo alfa estéril que contiene 1B	77531	-1,87	0,000592
1417275_at	Mal	mielina y proteína de linfocitos, proteína de diferenciación de células T n	17153	-1,87	0,002349
1449169_at	Has2	hialuronano sintasa 2	15117	-1,8	0,000707
1420005_s_at	Bmp15	proteína morfogenética ósea 15	12155	-1,78	0,002107
1449033_at	Tnfrsf11b	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 11b (osteoprotegerina)	18383	-1,76	0,00402
1433990_at	Lhfp13	pareja de fusión de lipoma HMGIC similar a 3	269629	-1,73	0,001503
1431229_at	lpw	gen impreso en la región del síndrome de Prader-Willi	16353	-1,71	0,0022
1429592_at	Lhfp13	pareja de fusión de lipoma HMGIC similar a 3	269629	-1,7	0,004465

Fig. 8B continuación

ID de la sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen Entrez	log(2) cambio 0 h vs. 8 h	adj. P.Val 0 h vs. 8 h
1457617_at	---	---	---	-1,64	0,008658
1434265_s_at	Ank2	anquirin 2, cerebro	109676	-1,64	0,006936
1449634_a_at	Anks1b	repetición de anquirina y motivo alfa estéril que contiene 1B	77531	-1,6	0,005666
1455436_at	Diras2	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 2	68203	-1,56	0,00813
1457429_s_at	Gm106	modelo génico 106 (NCBI)	226866	-1,56	0,000118
1425425_a_at	Wif1	Factor 1 inhibidor de Wnt	24117	-1,55	0,000336
1415921_a_at	Tnfrsf19	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 19	29820	-1,53	8,15E-05
1457948_at	Gas7	proteína 7-cb específica de detención del recimiento	14457	-1,53	0,006196
1439954_at	6430514M23Rik	ADNc de RIKEN	399595	-1,52	0,006504
1417709_at	Cyp46a1	citocromo P450, familia 46, subfamilia a, polipéptido 1	13116	-1,52	0,004364
1445247_at	C530044C16Rik	ADNc de RIKEN gen 6430514M23	319981	-1,52	0,000604
1428665_at	Pfn4	profilin family, member 4	382562	-1,51	0,006174
1448147_at	Tnfrsf19	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 19	29820	-1,47	2,14E-08
1456335_at	Gm106	modelo génico 106 (NCBI)	226866	-1,47	0,001787
1440546_at	9630002D21Rik	ADNc de RIKEN gen 6430514M23	319560	-1,44	0,003664
1450506_a_at	Aen	nucleasa potenciadora de la apoptosis	68048	-1,43	0,005422
1453041_at	Ano9	anotamina 9	71345	-1,41	0,000592
	4933403O03Rik				
1453700_s_at	EG245263	ADNc de RIKEN gen 6430514M23 /// gen predicho EG245263	245263 /// 74399	-1,41	0,004956

Fig. 8B continuación

ID de la sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen Entrez	log(2) cambio 0 h vs. 8 h	adj. P. Val 0 h vs. 8 h
1449478_at	Mmp7	matriz metalopeptidasa 7	17393	-1.39	0.009569
1452938_at	Anks1b	repetición de anquirina y motivo alfa estéril que contiene 1B	77531	-1.37	0.006568
1444541_at	---	---	---	-1.37	0.000828
1450728_at	Fjx1	caja 1 de cuatro conjuntos Drosophila	14221	-1.36	0.00323
1452728_at	Kirrel3	kin of IRRE like 3 (Drosophila)	67703	-1.36	0.005549
1430118_at	2700046A07Rik	similar a kin de IRRE 3 gen, 2700046A07	78449	-1.31	0.008169
1441272_at	Matr3	Matrina 3, ARNm (clon de ADNc MGC:28206 IMAGE:3989914)	17184	-1.29	0.002269
1419539_at	Irx4	homeocaja 4 relacionada con Iroquois (Drosophila)	50916	-1.26	0.005098
1442456_at	Spata5	asociado a espermatogénesis 5	57815	-1.26	0.006174
1456672_at	---	---	---	-1.24	0.006783
1439026_at	Trpm3	canal catiónico de potencial transitorio del receptor, subfamilia M, 1 miembro 3	226025	-1.23	0.006174
1440446_at	---	---	---	-1.21	0.001125
1426139_a_at	Ccr1	similar 1 al receptor de quimiocina (motivo C-C-)	252837	-1.2	0.009707
1435941_at	Rhbd13	similar 3 a veinlet romboide e 3 (Drosophila)	246104	-1.18	0.004465
1453645_at	2700046A07Rik	ADNc de RIKEN gen, 2700046A07	78449	-1.18	0.000692
1444905_at	DIEtd705e	segmento de ADN, Chr 1, ERATO Doi 705, expressed	51940	-1.17	0.003297
1422733_at	Fjx1	caja 1 de cuatro conjuntos Drosophila	14221	-1.14	0.007138
1423957_at	Aen	nucleasa potenciadora de la apoptosis	68048	-1.07	0.000391

Fig. 8B Continuación

ID de la sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen Entrez	log(2) cambio 0 h vs. 8 h	adj. P. Val 0 h vs. 8 h
1433084_at	4930402C16Rik	ADNc de RIKEN gen 4930402C16	73812	-1,07	0,006802
1421498_a_at	2010204K13Rik	ADNc de RIKEN gen 2010204K13	68355	-1,07	0,007469
1426981_at	Pcsk6	proteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 6	18553	-1,06	0,000506
1446846_at	---	---	---	-1,05	0,004364
1429861_at	Pcdh9	protocadherina 9	211712	-1,04	0,006174
1447958_at	---	---	---	-1,02	0,000592
1435608_at	LOC631806 /// Znrf3	similar al precursor homólogo de Goliath (proteína dedo anular 130) (r-goliath///dedo de cinc y anular 3)	407821 /// 631806	-1,02	0,000118
1456266_at	---	---	---	-1,02	0,002282
1421341_at	Axin2	axina 2	12006	-1,02	0,001447
1418495_at	Zc3h8	dedo de cinc de tipo CCH que contiene 8	57432	-1,01	0,000233

Fig. 9A

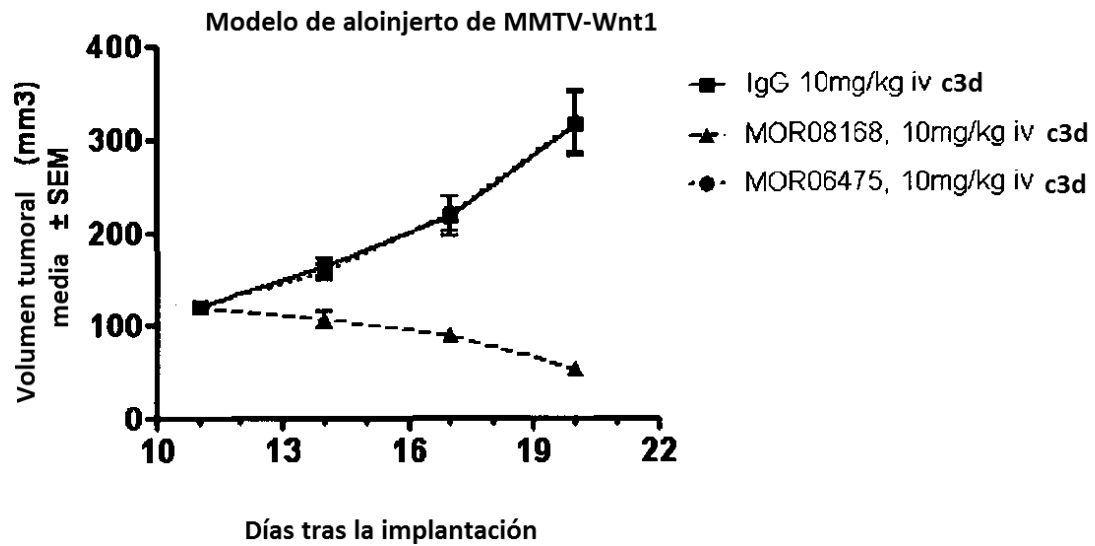


Fig. 9B

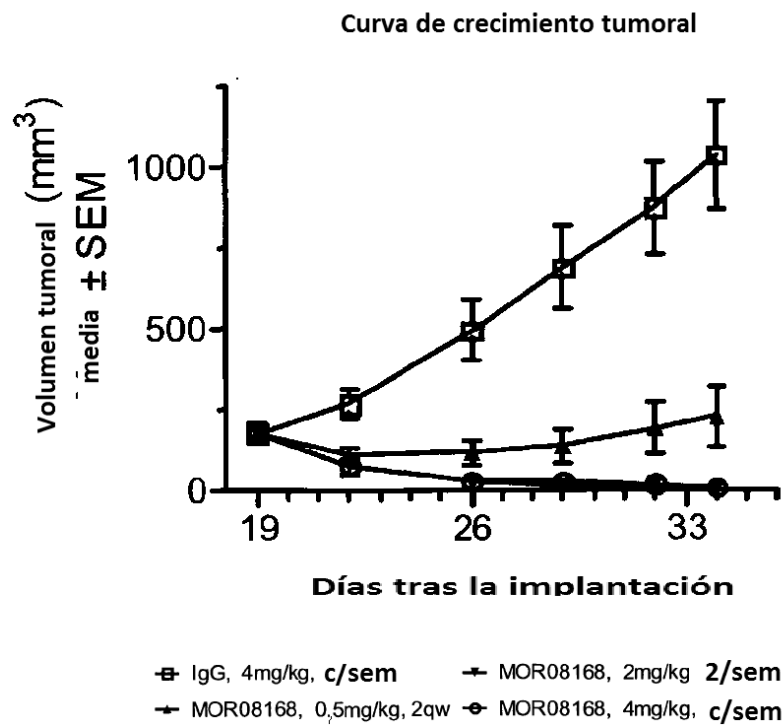


Fig. 10

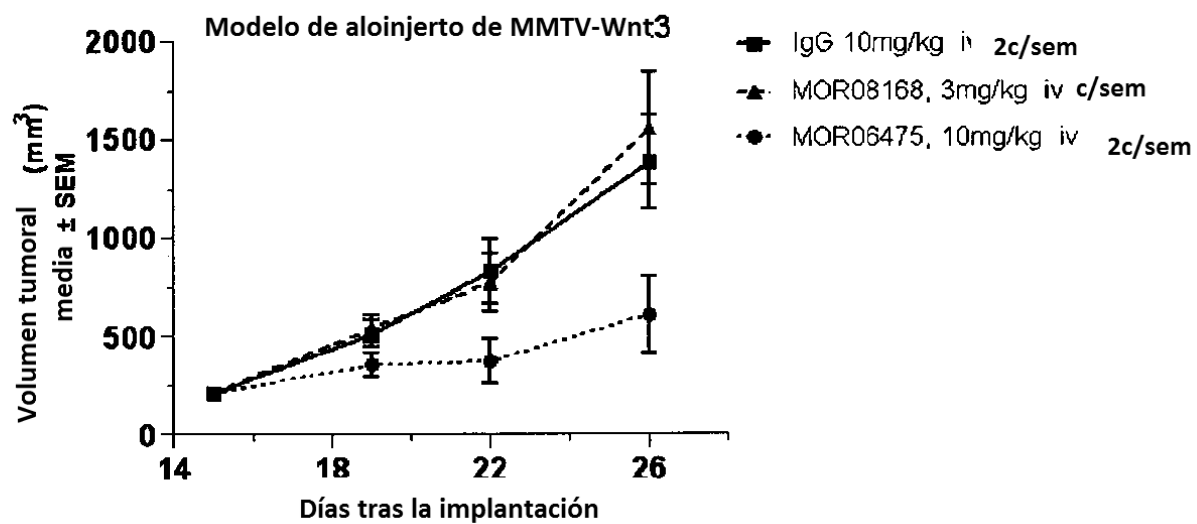


Fig. 11

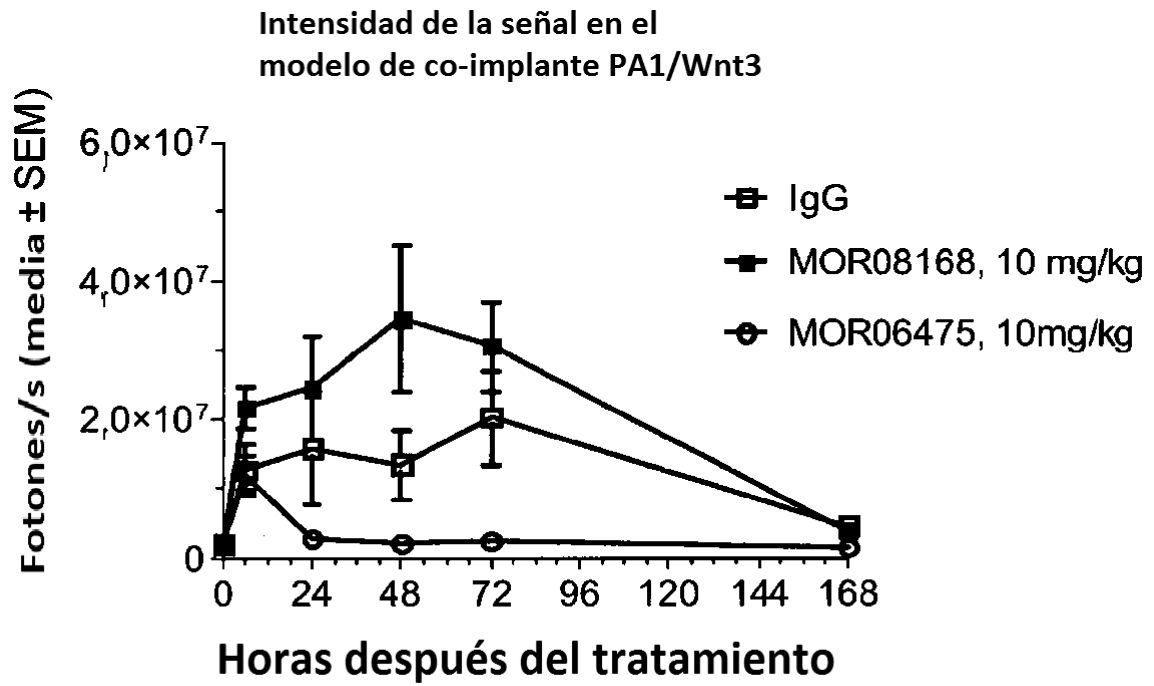


Fig. 12A



Fig. 12B

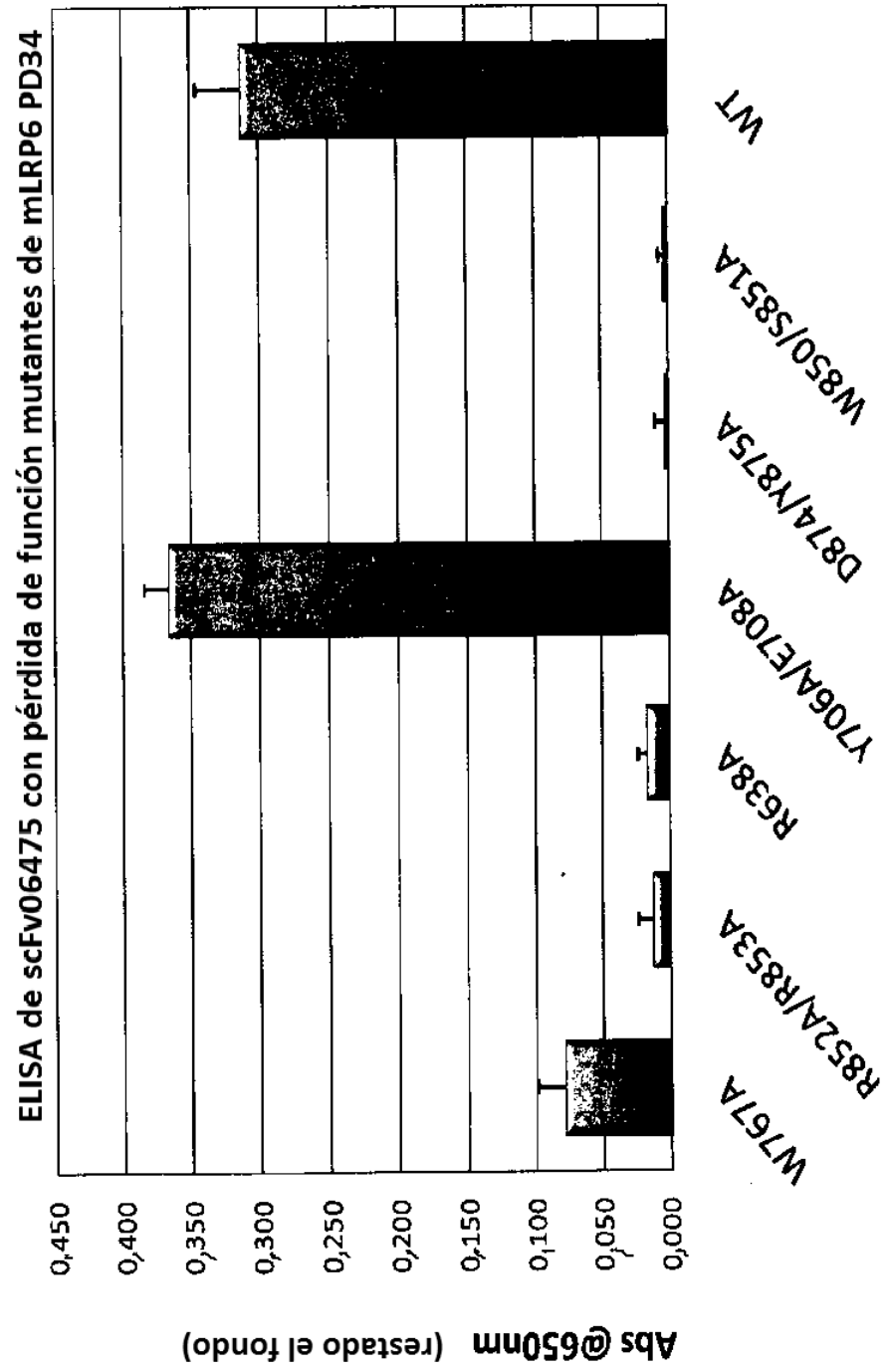


Fig. 13

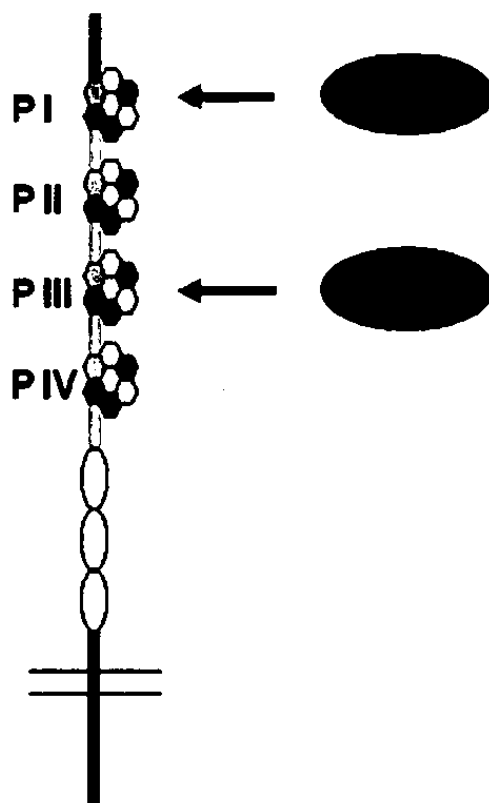


Fig. 14

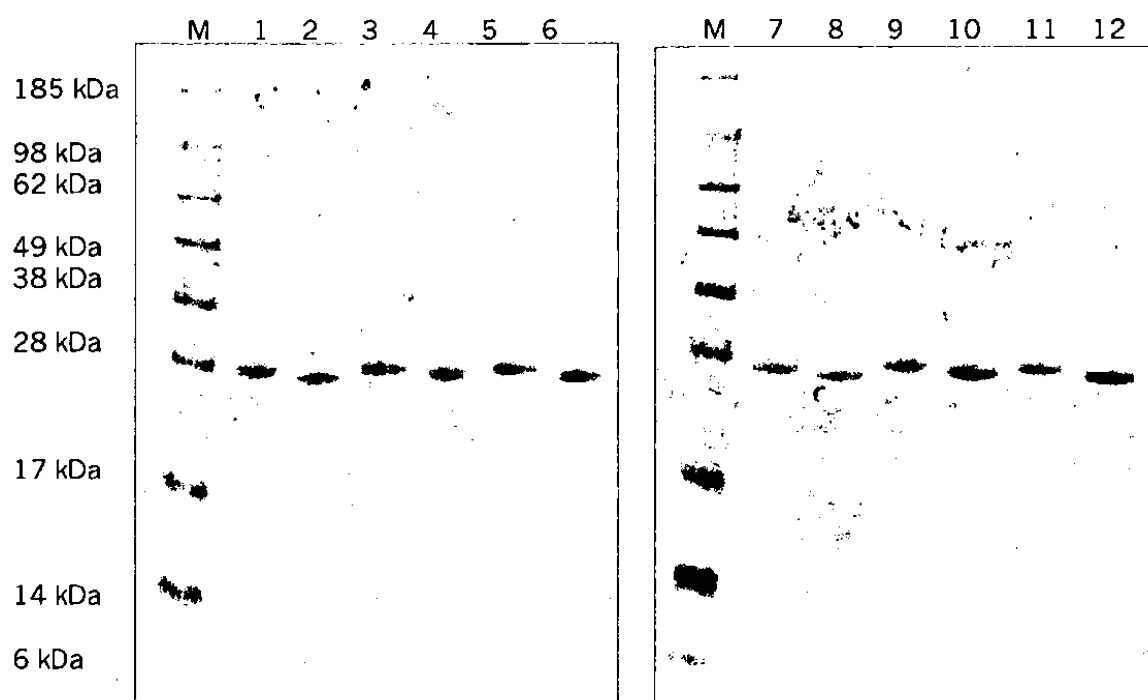


Fig. 15

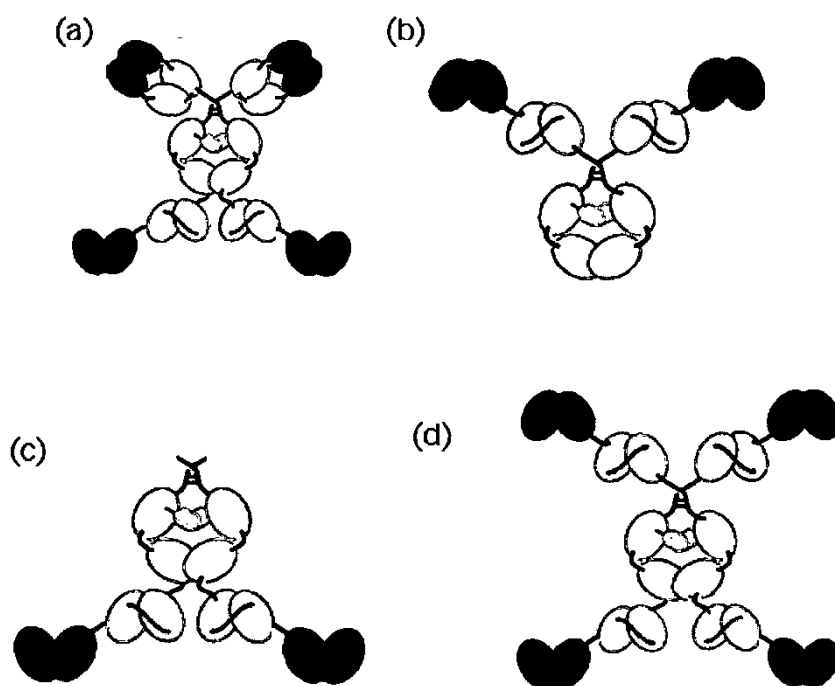


Fig. 16

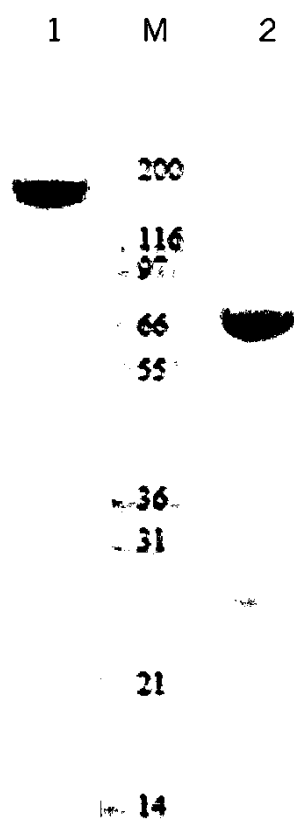


Fig. 17

Wnt1-STF

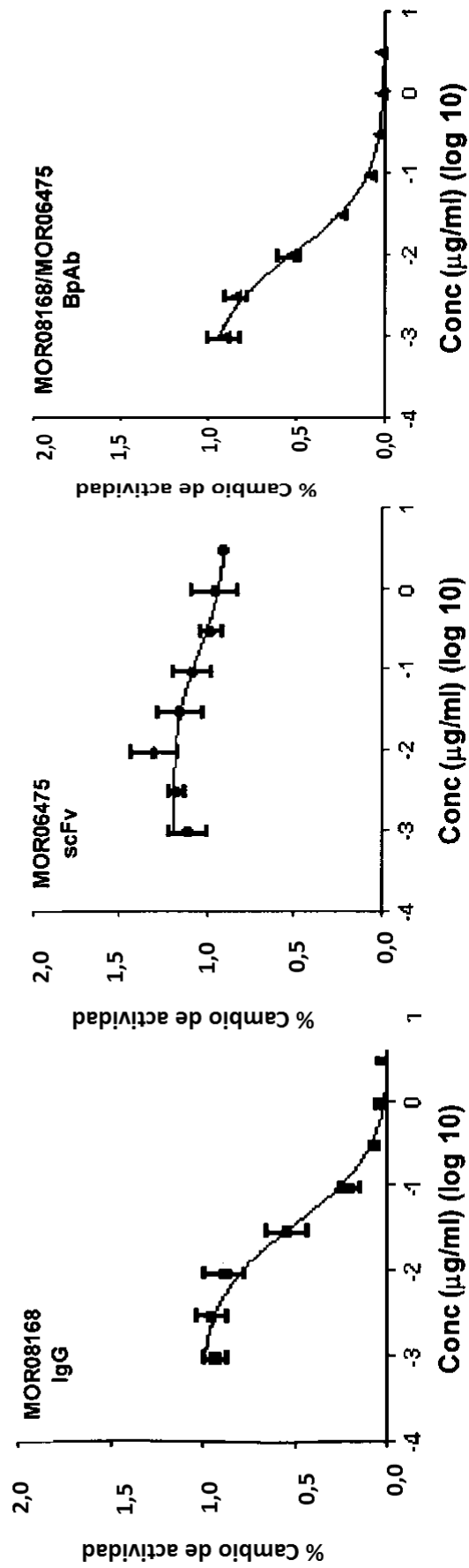


Fig. 17 continuación

Wnt3-STF

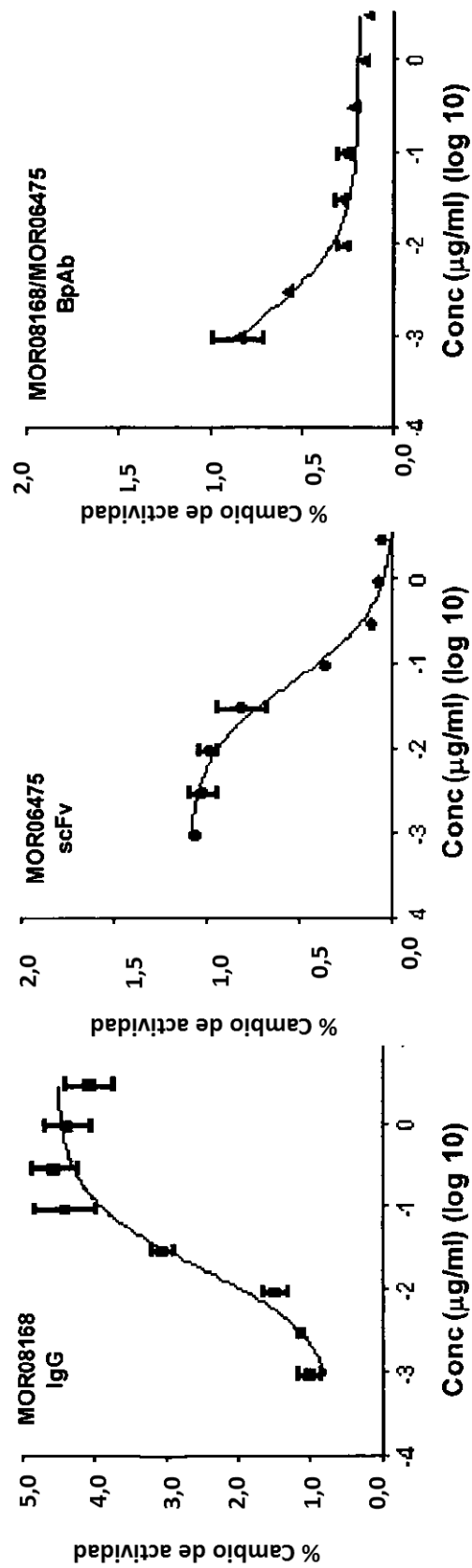


Fig. 18

	HEK STF IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	
	WNT1	WNT3a
MOR06475-sc-fv-VI-Vh	n/a	0,07
MOR06475-sc-fv-Vh-VI	n/a	0,06
MOR06475-sc-fv-VI-Vh-(GGGGS)3	n/a	0,08
MOR06475-sc-fv-Vh-VI-(GGGGS)3	n/a	0,08
MOR06475-Fab	n/a	0,11
MOR08168-sc-fv-VI-Vh	0,05	n/a
MOR08168-sc-fv-Vh-VI	0,06	n/a
MOR08168-sc-fv-VI-Vh-(GGGGS)3	0,07	n/a
MOR08168-sc-fv-Vh-VI-(GGGGS)3	0,1	n/a
MOR08168-Fab	0,15	n/a
MOR08545-sc-fv-VI-Vh	0,53	n/a
MOR08545-sc-fv-Vh-VI	0,06	n/a
MOR08545-sc-fv-VI-Vh-(GGGGS)3	n/a	n/a
MOR08545-sc-fv-Vh-VI-(GGGGS)3	0,05	n/a
MOR08545-Fab	0,05	n/a
anti-LRP6_MOR08168_hlgG1 LALA_6475scfv_at VL	0,013	0,0071
anti-LRP6_MOR06475_hlgG1 LALA_8168scfvatCH3_(VH-3-VL)	0,013	0,0082
anti-LRP6_MOR06475_hlgG1 LALA_8168scfvatCH3_(VH-4-VL)	0,016	0,0094
anti-LRP6_MOR08168_hlgG1 LALA_6475scfvatCH3_opt DPtoDA	0,02	0,0076
anti-LRP6_MOR08168_hlgG1 LALA_6475scfvatCH3_opt DPtoTA	0,026	0,0098
anti-LRP6_MOR08168_hlgG1 LALA_6475scfvatCH3_opt w/o-K	0,015	0,0064
MOR06475 IgG	n/a	0,0039
MOR08168 IgG	0,025	n/a
MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv	0,016	0,011

Fig. 19

Antibody	K _D (pM) Binding of Ab's to FcRn			
FcRn	huFcRn, pH6,0	huFcRn, pH7,4	cynoFcRn, pH6,0	cynoFcRn, pH7,4
MOR08168	0,023	LLB	0,28	LLB
MOR08168/6475 IgGAB	0,021	LLB	0,12	LLB

LLB: nivel de unión bajo

Fig. 20

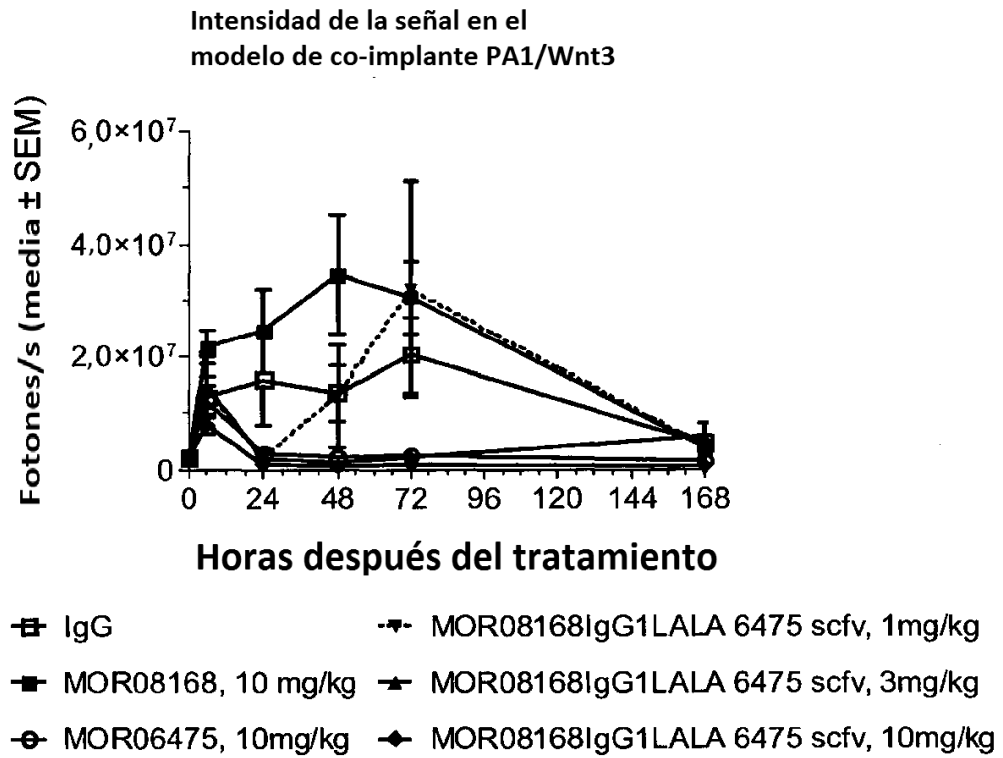


Fig. 21

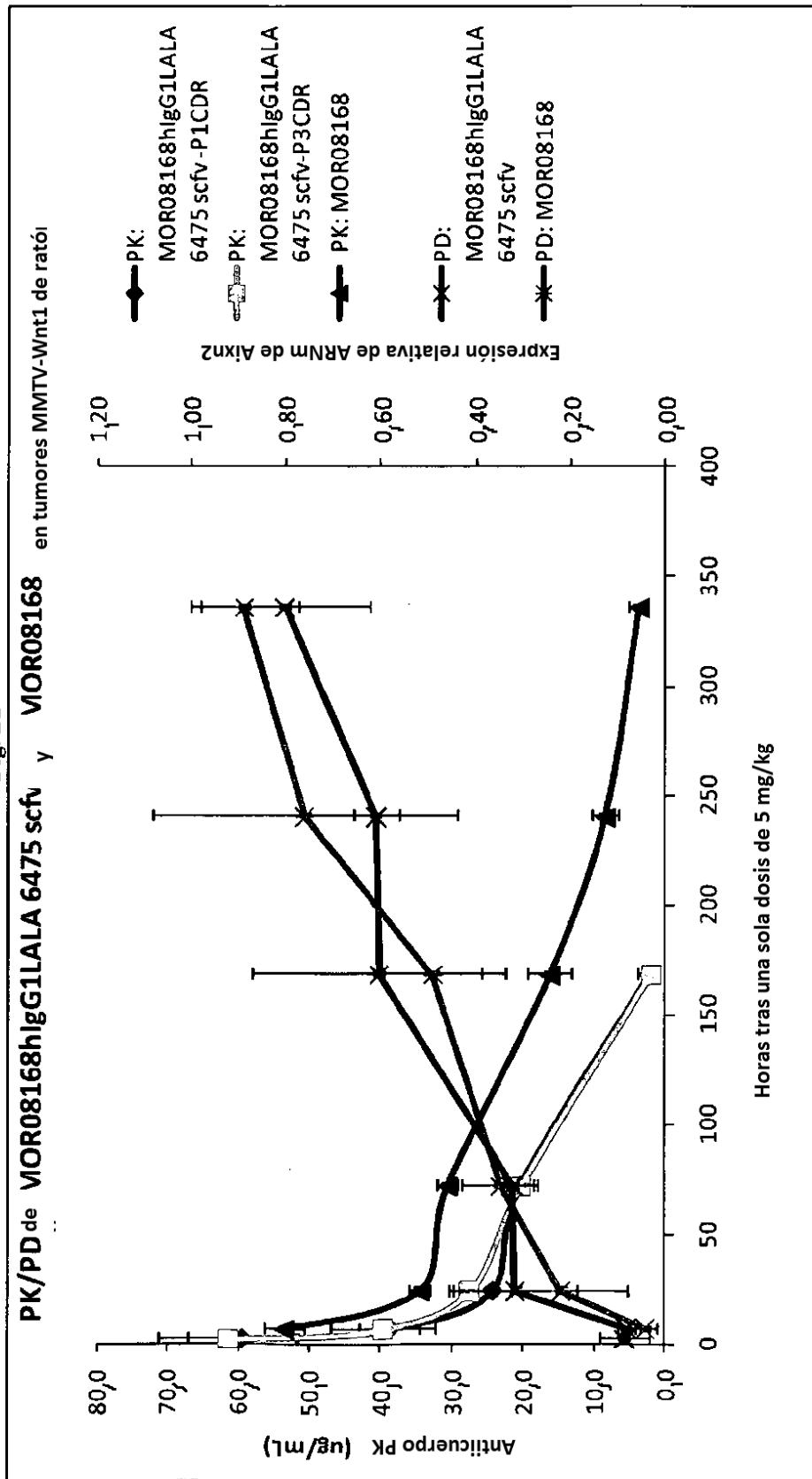


Fig. 22

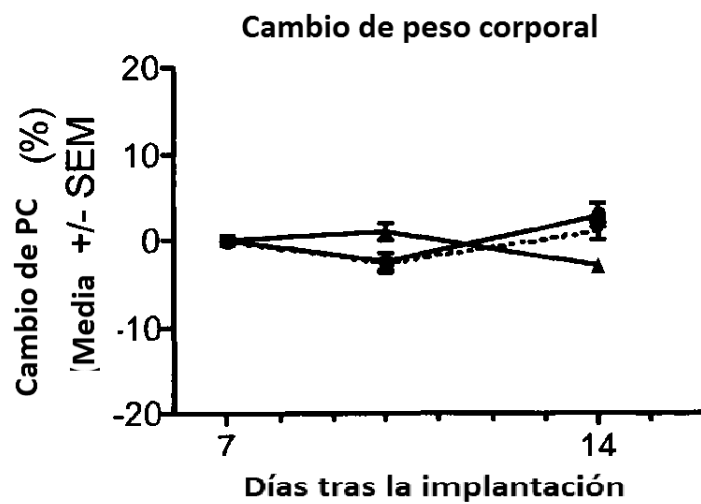
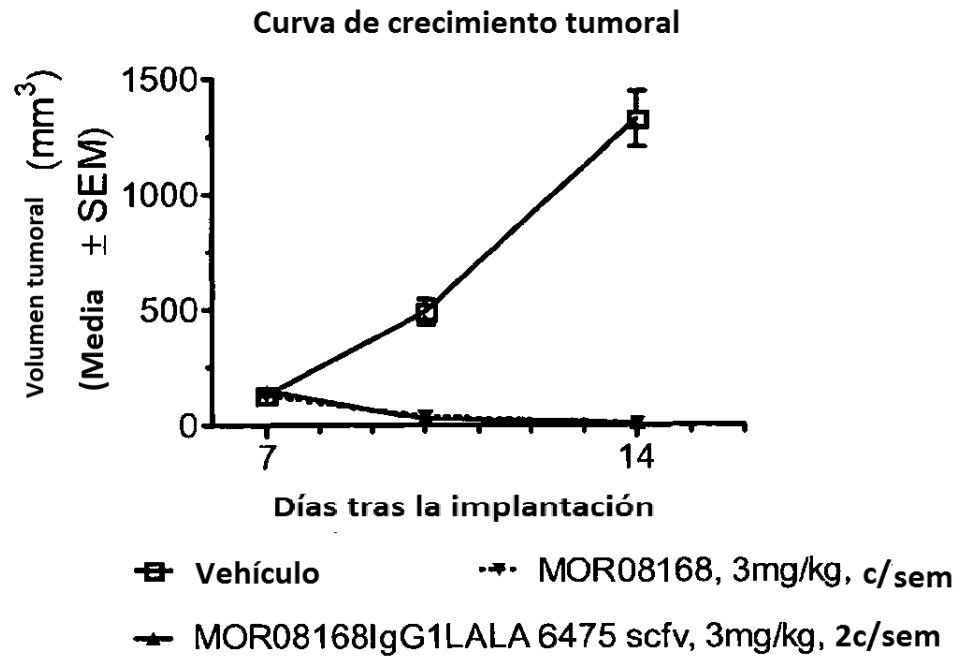


Fig. 23

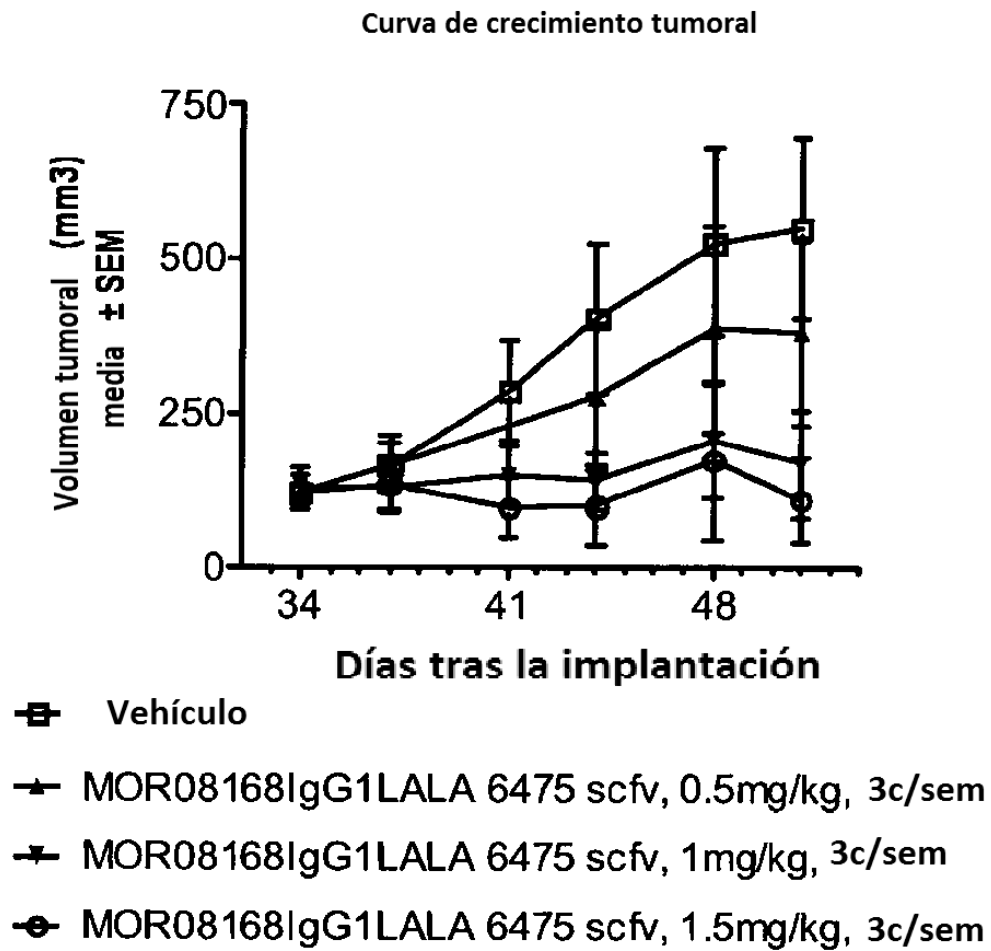


Fig. 24A



Fig. 24B

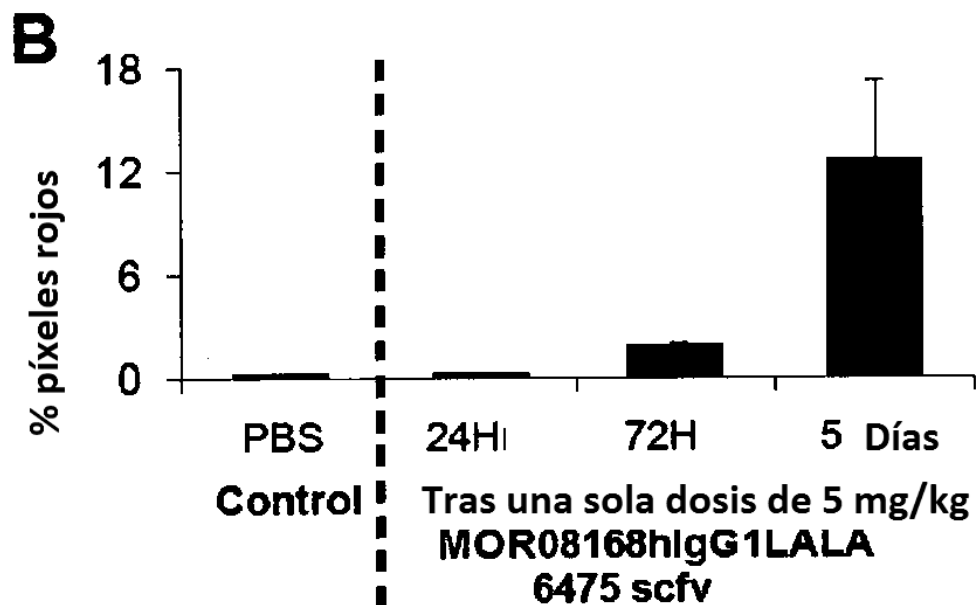


Fig. 25

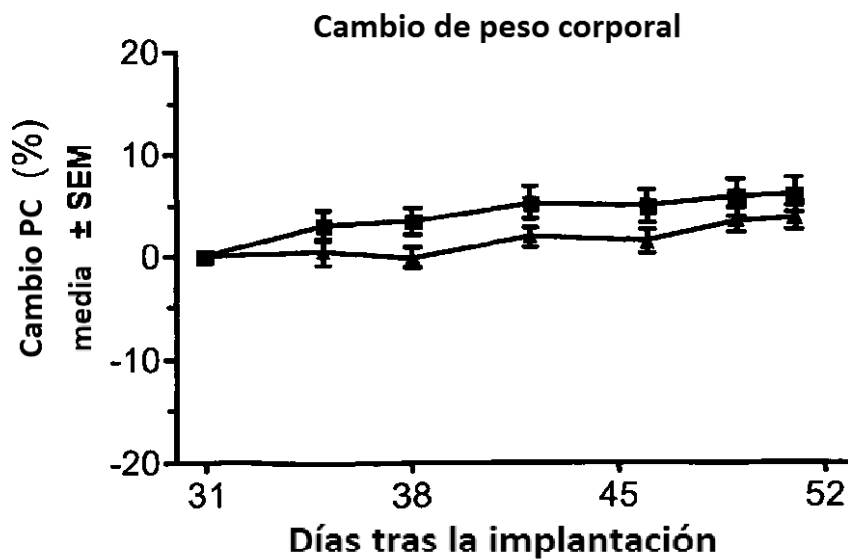
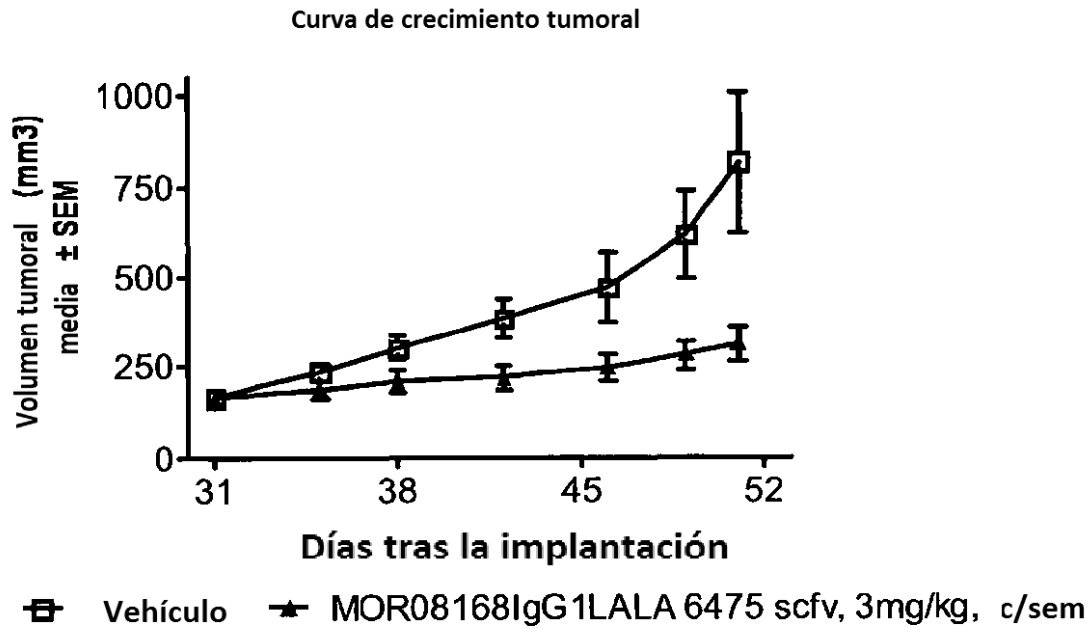


Fig. 26A

Resumen de la medición de D de MOR08168 IgG LALA 6475scFv, MOR08168 y MOR06475 que se unen a PD1/2 y PD3/4

Unión a PD1/2	K _D (1/25)	K _D (1/25)	K _D (1/25)	N
MOR08168 IgG LALA 6475scFV	1,27E+05	6,10E-05	8,68E-10	3
MOR08168	8,72E+04	9,05E-05	1,08E-09	4
Unión a PD3/4	K _D (1/25)	K _D (1/25)	K _D (1/25)	N
MOR08168 IgG LALA 6475scFV	2,11E+05	3,14E-04	1,93E-09	3
MOR06475	2,01E+05	2,17E-04	1,13E-09	4

Fig. 26B

Unión a PD1/2

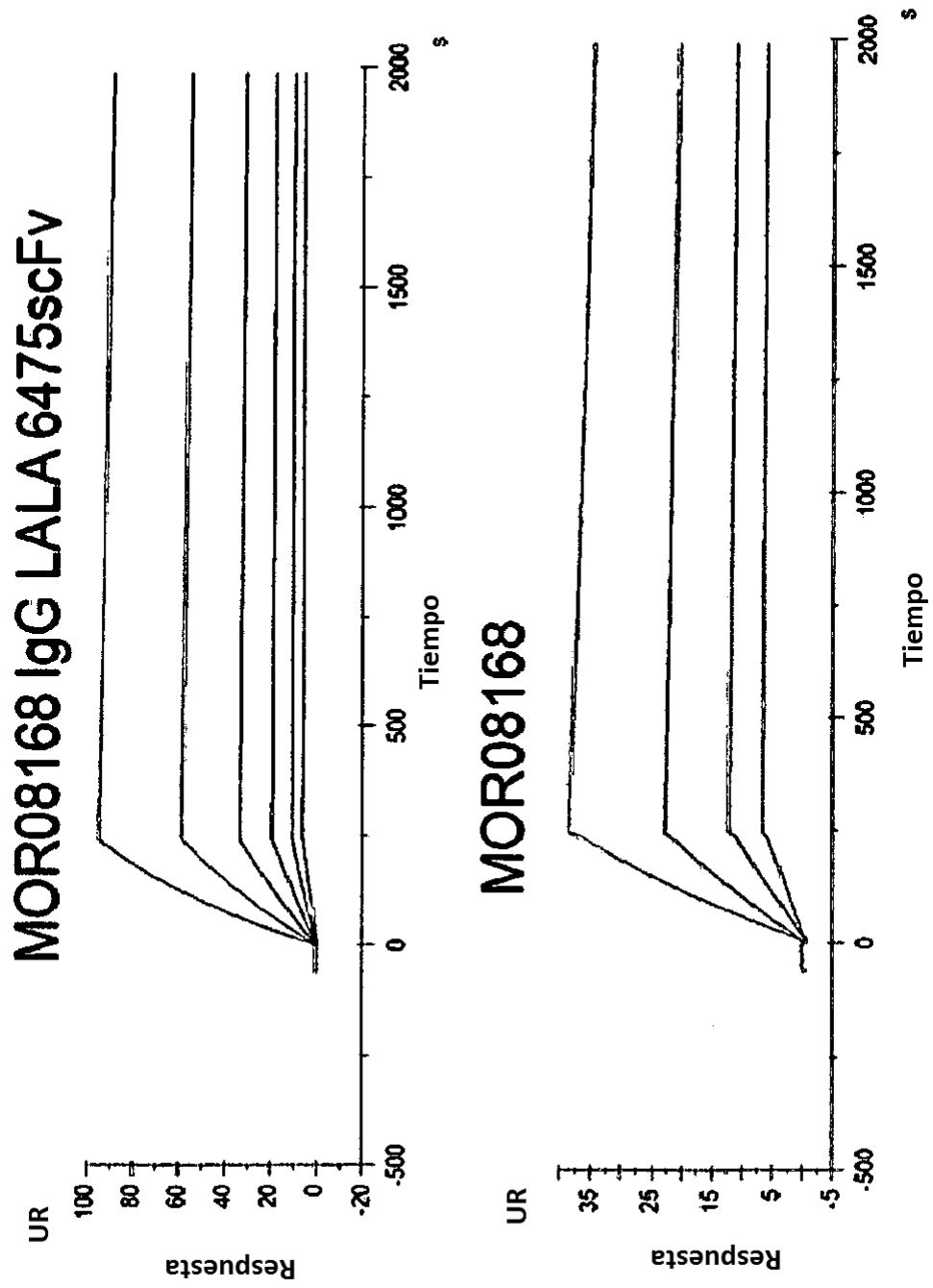
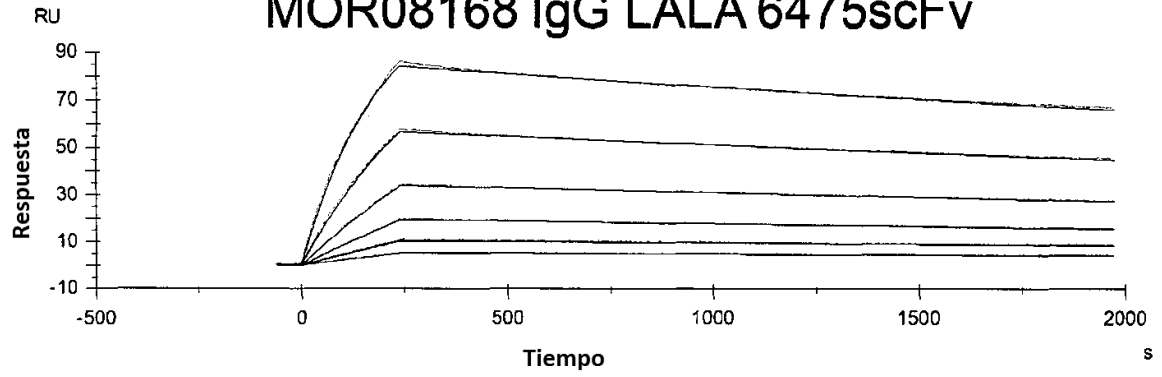


Fig. 26B continuación

Unión a PD3/4

MOR08168 IgG LALA 6475scFv



MOR06475

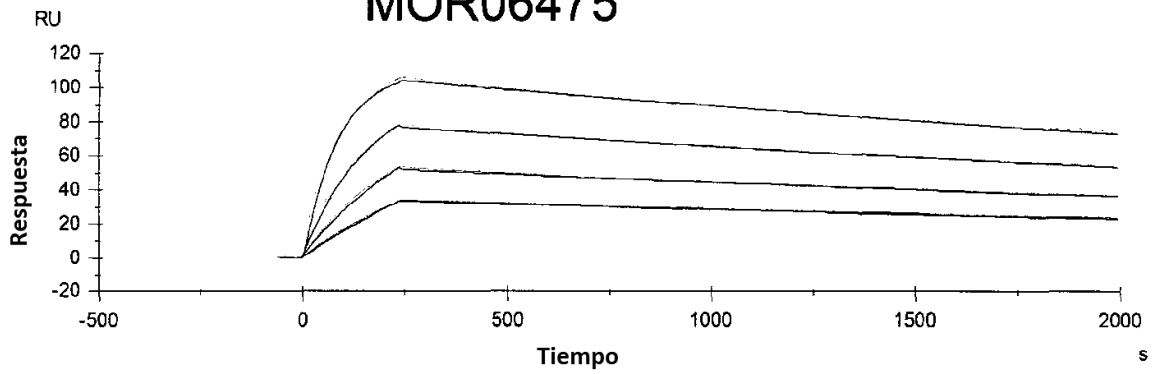


Fig. 26C

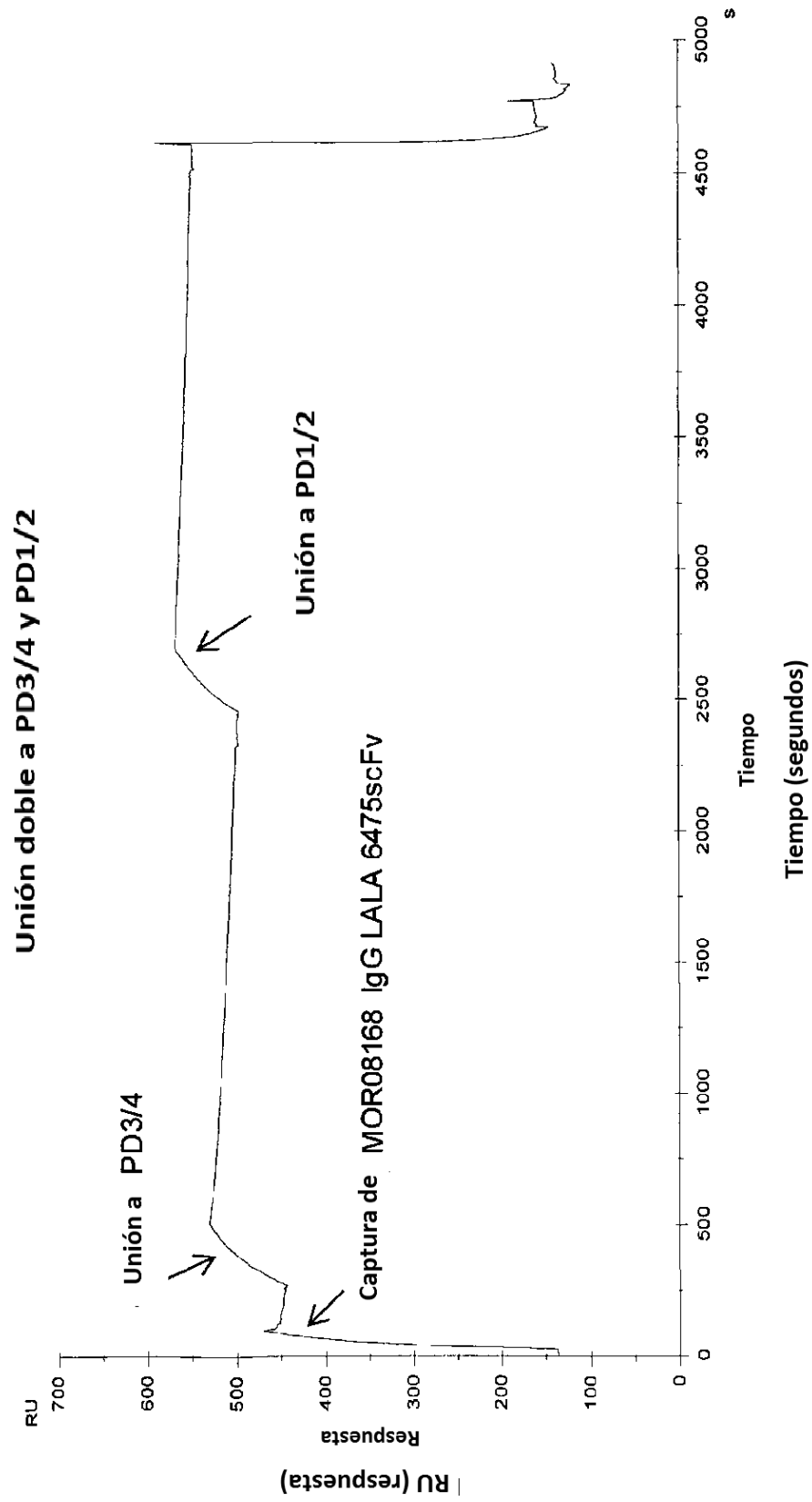


Fig. 27

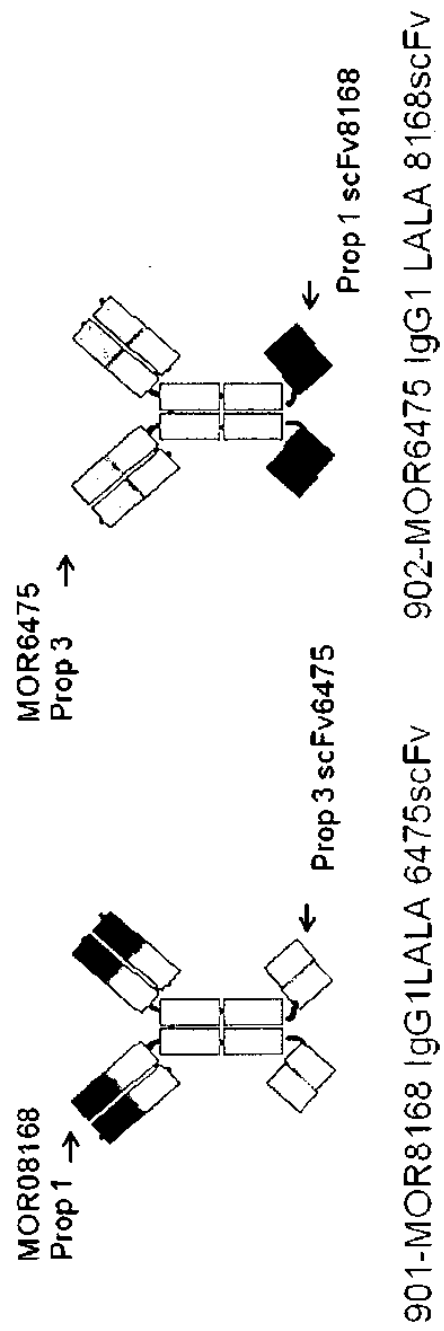
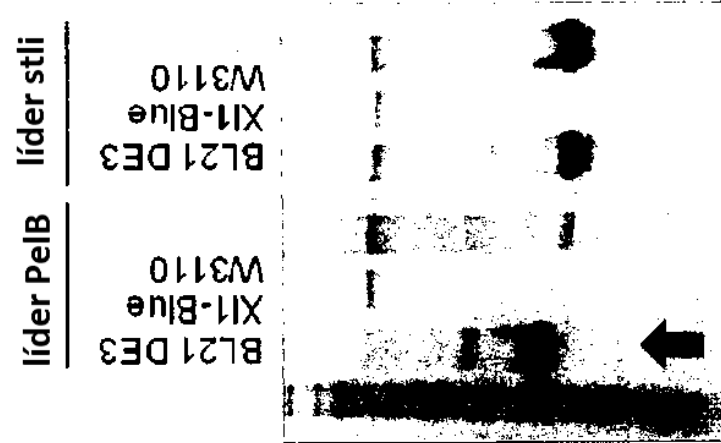


Fig. 28

b. Efecto de las cepas y construcciones bacterianas



a. Efecto de las secuencias líder

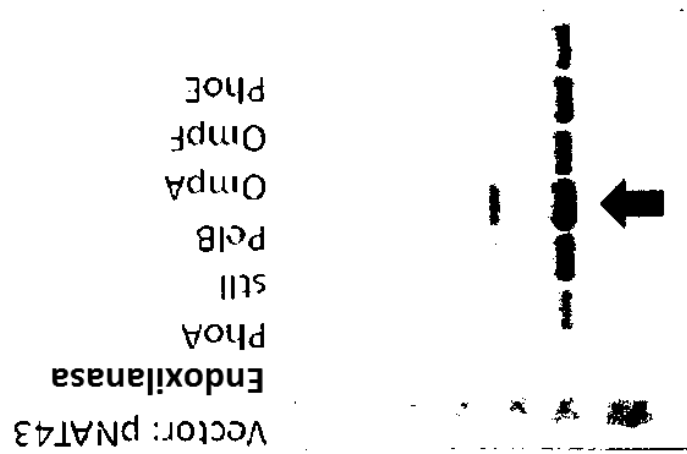


Fig. 29

Tm de mutaciones puntuales únicas en scFv06475			
ID de Constr.	mutación ^a	T _m en proteína de E.coli	T _m en proteína de mamífero
scFv06475 WT		59	61
6475-S2	VH:G34V	61	64
6475-S3	VH:I37F	61	64.5
6475-S6	VH:V85E	60	62.5
6475-S8	VH:M95F	61.5	64.5
6475-S9	VL:D93N	59.5	60.5

^a Se han usado los sistemas de numeración de Kabat y Chothian. La numeración es la misma para todas las mutaciones excepto VH:G34V en scFv6475. Esta sería VH:G32V en el sistema de numeración de Chothia. El sistema de numeración en el texto es el sistema de Kabat.

Fig. 30

T _m de mutaciones puntuales únicas en scFv08168		
ID de Constr.	mutación	T _m en proteína de E.coli ^a
WT	WT	48,50
B02	VH:V033N	50,50
B03-S1	VH:I034M	56,00
B04	VH:I034F	52,50
C05	VH:S049A	54,00
C07	VH:G050S	51,50
C08	VH:W052aG	55,50
C10	VH:H058Y	52,00
F11	VL:V047L	51,00
G02	VL:G064V	50,50
G07	VL:T078V	51,00

^a Las proteínas se expresan en la cepa Acella. Las muestras se analizaron mediante DSF sin eliminación de imidazol.

Fig. 31

Tm de mutaciones puntuales únicas en scFv08168				
ID de Constr.	mutación	T _m en proteína de E.coli ^a	T _m en proteína de mamíferos ^b	T _m en proteína de mamíferos
scFv08168 WT	WT	48,50	49	49
scFv08168 B02	VH:V33N	50,50		
scFv08168 B03-S1	VH:I34M	56,00	57	56,5
scFv08168 B04	VH:I34F	52,50		
scFv08168 C05	VH:S49A	54,00		
scFv08168 C07	VH:G50S	51,50		
scFv08168 C10	VH:H53Y	52,00		
scFv08168 F11	VL:V47L	51,00		
scFv08168 G02	VL:G64V	50,50		
scFv08168 G07	VL:T78V	51,00		

^a Las proteínas se expresaron en la cepa Acella. Las muestras se analizaron mediante DSF sin eliminación de imidazol

^b Proteína expresada de la suspensión de células 293T. Las muestras se analizaron mediante DSF sin eliminación de imidazol.

Fig. 31 continuación

Tm de mutaciones únicas vs dobles en scFv08163

ID de Constr.	mutación	T _m en proteína de E. coli ^a	T _m en proteína de mamíferos ^b	T _m en proteína de mamíferos
scFv08168D1	VH S49A, I34M	61	51,5	62,5
scFv08168D2	VH S49A, I34F	57,5	58	58,5
scFv08168D4	VH I34M, G50S	59,5	59,5	60
scFv08168D5	VH I34M, H58Y	59	59	59
scFv08168D6	VH I34M, V48I	57	56	57,5
scFv08168D7	VH I34M, VL S22T	57	57	58
scFv08168D8	VH I34M, VL V47L	57,5	56	58,5
scFv08168D9	VH I34M, VL G64V	57,5	58,5	57,5

^a Las proteínas se expresaron en la cepa Acella. Las muestras se analizaron mediante DSF sin eliminación de imidazol^b Proteína expresada de la suspensión de células 293T. Las muestras se analizaron mediante DSF sin eliminación de imidazol.

Fig. 32

Actividad de scFv06475, scFv08168 y las variantes en diferentes ensayos					
ID. de la constr.	Mutaciones	CD50 por ELISA nM	Afinidad por Proteon (nM)	CI50 por ensayo STF para inhibición de Wnt1 (nM)	CI50 por ensayo STF para inhibición de Wnt3a (nM)
scFv06475 WT		0,76	-	-	1,48
scFv06475-S2	VH:G34V	27,4	-	-	-
scFv06475-S3	VH:I37F	4,3	-	-	-
scFv06475-S6	VH:V85E	0,73	-	-	1,33
scFv06475-S8	VH:M95F	1,0	-	-	0,96
scFv06475-S9	VL:D93N	0,88	-	-	-
scFv08168 WT		2,04	3,82	7,41	-
scFv08168 B03-S1	VH:I34M	0,98	-	5,19	-
scFv08168-D1	VH S49A, I34M	1,61	2,55	2,44	-
scFv08168-D2	VH S49A, I34F	1,68	-	2,59	-
scFv08168-D4	VH I34M, G50S	1,47	-	5,56	-
scFv08168-D5	VH I34M, H58Y	1,22	-	-	-
scFv08168-D6	VH I34M, V48I	1,24	-	0,74	-
scFv08168-D7	VH I34M, VL S22T	1,15	-	4,81	-
scFv08168-D8	VH I34M, VL V47L	0,91	-	-	-
scFv08168-D9	VH I34M, VL G64V	1,26	-	11,11	-

Fig. 33

Ejemplos seleccionados de mutaciones estabilizantes

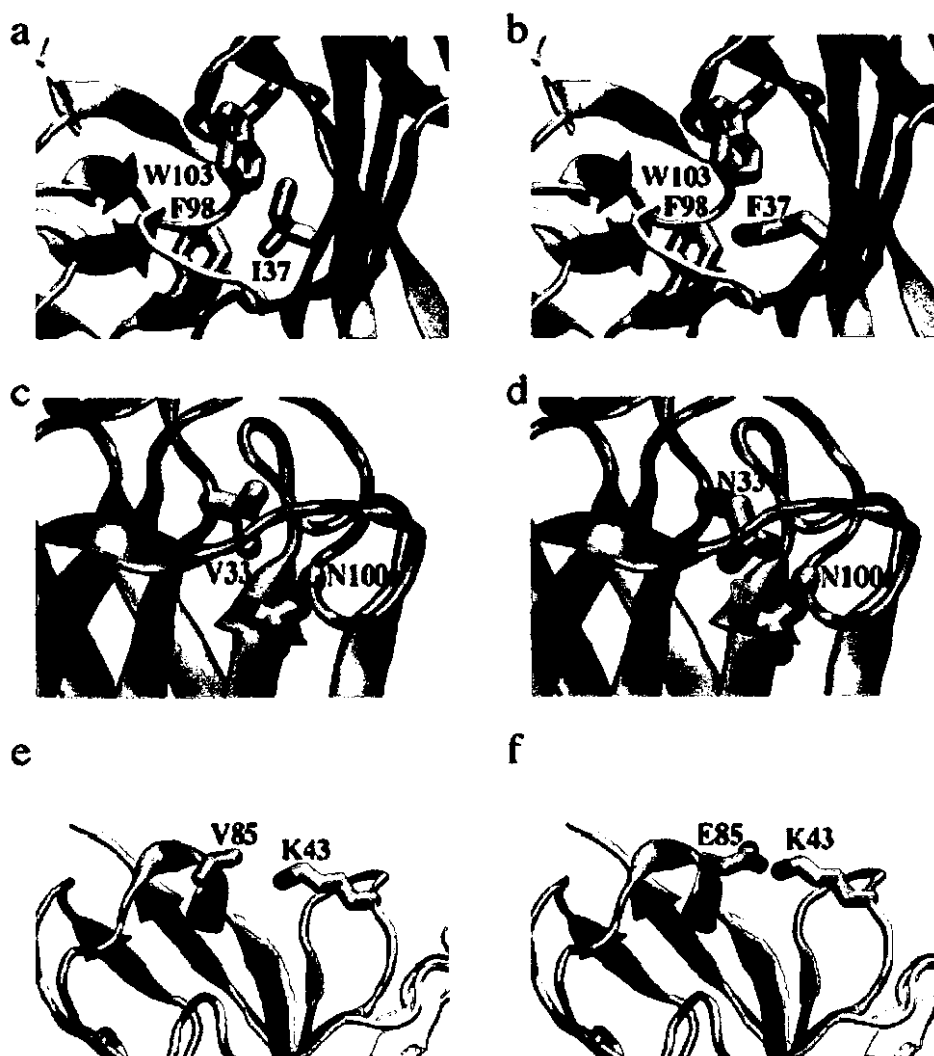


Fig. 34

Medición de la termoestabilidad de la fusión y moléculas biparatópicas basadas en IgG		
	T_m por DSF (Proteon STAT)	T_m por DSC
MOR6475 IgG1-scFv8168 (902wt)	47, 72.5	ND
MOR6475 IgG1-scFv8168 (902 mutant)	62, 76	ND