

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 341**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2013 PCT/JP2013/077540**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14054820**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2013 E 13843070 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2905335**

54 Título: **Anticuerpo anti-DLK-1 humana con actividad antitumoral in vivo**

30 Prioridad:

03.10.2012 US 201261709282 P

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

25.04.2018

73 Titular/es:

**CHIOME BIOSCIENCE INC. (100.0%)
3-12-1 Honmachi, Shibuya-ku
Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAMURA, KOJI;
YANAI, HIROYUKI;
KANKE, TORU;
TSURUSHITA, NAOYA y
KUMAR, SHANKAR**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 665 341 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-DLK-1 humana con actividad antitumoral *in vivo*

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-Dlk-1 humana que tienen actividad antitumoral y particularmente a anticuerpos anti-Dlk-1 humana que tienen actividad antitumoral *in vivo*. Además, la presente invención también se refiere a hibridomas que producen los anticuerpos mencionados anteriormente y a un uso de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Antecedentes de la invención

La Dlk-1 humana (homólogo de tipo delta 1 (Drosophila); que se puede denominar en lo sucesivo como "hDlk-1") es una proteína transmembrana de tipo I (de tipo transmembrana uno) con una longitud total de 383 restos de aminoácidos que tiene 6 motivos de tipo EGF en su región extracelular. La región extracelular presenta homología con una familia Notch/Delta/Serrate. Un gen hDlk-1 ha sido clonado como una molécula expresada en una línea celular derivada de carcinoma de pulmón microcítico sensible a GRP (péptido liberador de gastrina) (Documento No de Patente 1), o como un factor para la supresión de la diferenciación de preadipocitos (Documento No de Patente 2). Desde el punto de vista de la homología de la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 con la de Delta que es un ligando de un receptor Notch como un regulador de la diferenciación celular, tal Dlk-1 es citada generalmente con el símbolo génico, DLK1. También tiene algunos otros símbolos génicos tales como Pref-1 (Documento No de Patente 2), pG2 (Documento No de Patente 3), SCP-1 (Documento No de Patente 4) y ZOG (Documento No de Patente 5). Sin embargo, estos símbolos génicos indican básicamente la misma molécula.

Por otra parte, hDlk-1 se escinde con una proteasa no identificada que corta en las proximidades de la membrana celular en la región extracelular de hDlk-1, y se secreta a continuación a la sangre. La hDlk-1 libre (región extracelular de hDlk-1) es una molécula idéntica a una glicoproteína llamada FA-1 (Antígeno fetal 1) (Documento No de Patente 6) que consiste en 225 a 262 restos de aminoácidos.

El gen hDlk-1 y un producto génico del mismo se expresan en un alto nivel en las células no diferenciadas, altamente proliferativas, fetales. En particular, el gen hDlk-1 y el producto génico del mismo son muy expresados en hígado fetal, riñón fetal, músculo esquelético fetal, cerebro fetal y similares. Después del nacimiento, sin embargo, la expresión de tal gen hDlk-1 y del producto génico del mismo puede no ser observado en la mayoría de los tejidos. En tejidos adultos normales, el gen hDlk-1 y el producto génico del mismo se localizan en la glándula suprarrenal, la placenta y la hipófisis (Documento de Patente 1, Documento No de Patente 2).

Además, incluso en tejidos maduros, la expresión de hDlk-1 se observó en células que se considera que son células madre no diferenciadas o células precursoras. Por ejemplo, se ha descrito que la expresión de hDlk-1 se ha observado en células ovales hepáticas que son indiferenciadas y son pluripotentes en el hígado adulto (Documentos No de Patente 7 y 8) o en células madre mesenquimales que son las células madre de las células óseas/de cartílago/adiposas (Documento No de Patente 9) y en células precursoras del epitelio prostático en la capa de células basales de la próstata (Documento No de Patente 18). Además, también se ha descrito que, en el caso de las células madre mesenquimales de ratón, la Dlk-1 libre (región extracelular Dlk-1 de ratón) activa la ERK/MAP quinasa e induce la expresión de Sox-9, de modo que puede suprimirse la diferenciación de las células en adipocitos y, al mismo tiempo, puede inducirse la diferenciación de las células en condrocitos, pero esa Dlk-1 libre suprime la diferenciación de las células en osteoblastos y la maduración de los condrocitos (Documentos No de Patente 19 y 20). Se ha sugerido que hDlk-1 está asociada con las propiedades de tales células madre de tejidos, tales como el mantenimiento de la capacidad de indiferenciación.

Tal patrón de expresión de hDlk-1 restringido a las células fetales o células madre y una familia de genes/productos génicos que tienen motivos de tipo EGF (receptor Notch, ligando de Notch (Delta, Jagged, Serrate), etc.) generalmente controla el crecimiento o la diferenciación de células mediante la interacción intercelular a través de motivos de tipo EGF. Por lo tanto, se ha sugerido que hDlk-1 también tiene tales funciones. De hecho, se ha conocido que la expresión de hDlk-1 disminuye simultáneamente con la diferenciación de las células precursoras de adipocitos y que la diferenciación en adipocitos se suprime, si el gen hDlk-1 se ve obligado a expresarse en las células precursoras de adipocitos (Documento No de Patente 2). Sin embargo, en la actualidad, los detalles con respecto a una molécula (un ligando) que interactúe con hDlk-1 son desconocidos.

Por otra parte, se ha descrito que el gen hDlk-1 y el producto génico del mismo se expresan con una alta frecuencia en diversos tipos de cánceres o tumores. Los tipos de cáncer, en los que la expresión de hDlk-1 se ha confirmado hasta el momento, son: cánceres sólidos tales como tumor neuroendocrino, neuroblastoma, glioma, neurofibromatosis de tipo 1, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, cáncer de riñón y cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de páncreas (Documentos de Patente 1, 2, 4 y 5 y Documentos No de Patente 1, 3, 10, 11, 12, 13 y 14 y 21); y neoplasias sanguíneas tales como el síndrome mielodisplásico (Documento de Patente 3 y Documentos No de Patente 15 y 16) y leucemia mielocítica aguda (Documento No de Patente 16). Se

ha descrito que el crecimiento celular se acelera si se introduce un gen hDlk-1 en una célula K562 que es una línea celular de eritroleucemia (Documento No de Patente 16) y también que, si tal gen hDlk-1 se introduce en glioblastomas, provoca la desaparición de la inhibición por contacto de las células, así como la aceleración del crecimiento celular, de manera que se puede lograr la capacidad de crecimiento celular independiente del anclaje. Se ha sugerido la relación entre hDlk-1 y la carcinogénesis Documento No de Patente 17)

Convencionalmente, como anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 que muestran citotoxicidad en células de cáncer de hígado humano *in vitro* en presencia de complemento, se conocen anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 de rata 1C1, 4C4 y 31C4 (nombres de los clones) (Documento de Patente 1). Por otro lado, estos anticuerpos de clones también se sabe que son anticuerpos que no muestran actividad antitumoral (actividad inhibidora del crecimiento tumoral) *in vivo* (en modelos de tratamiento con ratones portadores de células cancerosas humanas) (Documentos de Patente 4 y 5).

Documento de Patente 1: WO 2005/052156

Documento de Patente 2: WO 02/081625

Documento de Patente 3: Solicitud de patente japonesa abierta a consulta pública N.º 2001-269174

Documento de Patente 4: WO 2008/056833

Documento de Patente 5: WO 2009/116670

Documento No de Patente 1: Laborda, J. et al., J. Biol. Chem., vol. 268 (6), pp. 3817-3820 (1993)

Documento No de Patente 2: Smas, C. M. et al., Cell, vol. 73 (4), pp.725-734 (1993)

Documento No de Patente 3: Helman, L. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, pp. 2336-2339 (1987)

Documento No de Patente 4: Maruyama, K. et al., No publicado, Número de acceso Genbank D16847 (1993)

Documento No de Patente 5: Halder, S. K. et al., Endocrinology, vol. 139, pp. 3316-3328 (1998)

Documento No de Patente 6: Fay, T. N. et al., Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., vol. 29, pp. 73-85 (1988)

Documento No de Patente 7: Tanimizu, N. et al., Gene Expression Patterns, vol. 5, pp. 209-218 (2004)

Documento No de Patente 8: Jensen, CH. et al., Am. J. Pathol., vol. 164 (4), pp.1347-1359 (2004)

Documento No de Patente 9: Abdallah, B. M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 19 (5), pp. 841-852 (2004)

Documento No de Patente 10: Jensen, C. H. et al., Br. J. Dermatol., vol. 140 (6), pp. 1054-1059 (1999)

Documento No de Patente 11: Jensen, C. H. et al., Tumour Biol., vol. 20 (5), pp. 256-262 (1999)

Documento No de Patente 12: Yin, D. et al., Int. J. Oncol., vol. 24 (4), pp. 1011-1015 (2004)

Documento No de Patente 13: Yin, D. et al., Oncogene, vol. 25 (13), pp. 1852-1861 (2006)

Documento No de Patente 14: Fukuzawa, R. et al., J. Clin. Pathol., vol. 58, pp. 145-150 (2006)

Documento No de Patente 15: Miyazato, A. et al., Blood, vol. 98, pp. 422-427 (2001)

Documento No de Patente 16: Sakajiri, S. et al., Leukemia, vol. 19 (8), pp. 1404-1410 (2005)

Documento No de Patente 17: Yin, D. et al., Oncogene, vol. 25 (13), pp. 1852-1861 (2006)

Documento No de Patente 18: Ceder, J. A. et al., Eur. Urol., Vol. 54(6), pp. 1344-1353 (2008)

Documento No de Patente 19: Sul, HS., Mol. Endocrinol., Vol. 23 (11), pp. 1717-1725 (2009)

Documento No de Patente 20: Wang, Y. et al., Mol. Cell Biol., Vol. 30(14), pp. 3480-3492 (2010)

Documento No de Patente 21: Yanai, H. et al., J. Biochem., Vol. 148(1), pp. 85-92 (2010).

Sumario de la invención

Como se describió anteriormente, en el caso de los tejidos normales, la expresión de hDlk-1 se restringe a las células embrionarias o a las células madre. Sin embargo, en el caso de tejidos cancerosos, hDlk-1 se expresa con una alta frecuencia en diversos tipos de células. Tal hDlk-1 es una proteína de la membrana celular/proteína secretora. Basándose en estos hechos, se considera que hDlk-1 es una buena diana en el tratamiento de diversos tipos de tumores, etc. Cuando se elige como diana tal hDlk-1, se considera que es útil un anticuerpo anti-hDlk-1. Para ser utilizado como un anticuerpo para la terapia del cáncer, por ejemplo, el anticuerpo más deseablemente tiene la capacidad de retener una actividad de unión al antígeno estable en una formulación líquida y en sangre humana o de mono, así como mostrar una actividad antitumoral significativa mediante la administración del anticuerpo solo en modelos de tratamiento de ratón portadores de cáncer humano

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-Dlk-1 humana que tenga actividad antitumoral y, en particular, un anticuerpo monoclonal anti-Dlk-1 humana que tenga actividad antitumoral *in vivo*. Por otra parte, otro objeto de la presente invención es proporcionar un hibridoma que produzca el anticuerpo anteriormente mencionado, un complejo del anticuerpo anteriormente mencionado y un agente, y similares. Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para el diagnóstico o tratamiento de un tumor, una composición farmacéutica para inducir apoptosis en células tumorales, un agente terapéutico antitumoral, un agente de diagnóstico tumoral, un agente para inducir apoptosis en células tumorales, un método para tratar tumores, un método para detectar tumores, un método para inducir apoptosis en células tumorales, un kit para detectar o diagnosticar tumores y un kit para inducir apoptosis en células tumorales, cada uno de los cuales comprende el anticuerpo mencionado anteriormente, el complejo anteriormente mencionado o similares.

Los autores de la presente invención han realizado estudios exhaustivos dirigidos a la consecución de los objetos mencionados anteriormente. Como resultado, los autores de la presente invención han encontrado un anticuerpo que reacciona específicamente con la Dlk-1 humana (concretamente, un anticuerpo monoclonal anti-Dlk-1 humana)

y que tiene actividad antitumoral (concretamente, un anticuerpo anti-Dlk-1 humanizado). Los inventores han confirmado que dichos anticuerpo y complejo tienen actividad antitumoral *in vivo*. Además los autores de la presente invención han logrado producir el anticuerpo mencionado anteriormente, que es un anticuerpo humanizado. Aún más, los autores de la presente invención también han encontrado que dichos anticuerpo y complejo son útiles para el tratamiento, diagnóstico y detección de un tumor, y la inducción de la apoptosis en células tumorales, completando de este modo la presente invención.

Es decir, la presente invención es como se describe a continuación.

- 10 (1) Un anticuerpo contra Dlk-1 humana, en el que la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 35, 40, 69, 73, 77, 81, 85 y 89, y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45.
- 15 El anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior es un anticuerpo que tiene una actividad antitumoral *in vivo*, por ejemplo. En la presente memoria, el tumor es al menos de un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de páncreas humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neuroblastoma humano.
- El anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior es un anticuerpo humanizado, por ejemplo.
- El anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo.
- 20 El anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior es, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a al menos una porción de una región que comprende aminoácidos en las posiciones 24 a 91 en la secuencia de aminoácidos de Dlk-1 humana que se muestra en la SEQ ID NO: 2.
- (2) Un fragmento de anticuerpo derivado del anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior. Los ejemplos del fragmento de anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior incluyen un fragmento de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 35, 40, 69, 73, 77, 81, 85 y 89, y un fragmento de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45; y un fragmento de anticuerpo que comprende tanto la secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 35, 40, 69, 73, 77, 81, 85 y 89 y un fragmento de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45.
- 25 (3) Un complejo anticuerpo-agente, que comprende el anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior y un compuesto que tiene una actividad antitumoral y/o una actividad destructora de células.
- (4) Un complejo fragmento de anticuerpo-agente, que comprende el fragmento de anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior y un compuesto que tiene una actividad antitumoral y/o una actividad destructora de células.
- 30 (5) Una composición farmacéutica, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior y el complejo de acuerdo con los apartados (3) o (4) anteriores.
- La composición farmacéutica de acuerdo con el apartado (5) anterior se usa en el tratamiento de tumores, por ejemplo, y un ejemplo particular de la composición farmacéutica es una composición farmacéutica, que no causa reducción de peso como efecto secundario. Además, la composición farmacéutica de acuerdo con el apartado (5) anterior se usa en el diagnóstico de tumores, por ejemplo. Además, la composición farmacéutica de acuerdo con el apartado (5) anterior se usa en la inducción de apoptosis en células tumorales, por ejemplo.
- 35 (6) Un agente terapéutico anti-tumoral, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior y el complejo de acuerdo con los apartados (3) o (4) anteriores.
- 40 Un ejemplo del agente terapéutico anti-tumoral de acuerdo con el apartado (6) anterior es un agente terapéutico anti-tumoral, que no causa reducción de peso como efecto secundario.
- (7) Un agente para inducir apoptosis en células tumorales, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior y el complejo de acuerdo con los apartados (3) o (4) anteriores.
- 45 En la presente memoria, en la composición farmacéutica de acuerdo con el apartado (5) anterior, el agente terapéutico anti-tumoral de acuerdo con el apartado (6) anterior y el agente inductor de apoptosis de acuerdo con el apartado (7) anterior, el tumor es al menos un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de páncreas humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neuroblastoma humano.
- 50 (8) Un método para tratar un tumor, que comprende administrar a un paciente al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior y el complejo de acuerdo con los apartados (3) o (4) anteriores.
- Un ejemplo del método de tratamiento de acuerdo con el apartado (8) anterior es un método de tratamiento, que no provoca reducción de peso como un efecto secundario.
- 55 (9) Un método para detectar un tumor, que comprende: permitir al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior y el complejo de acuerdo con los apartados (3) o (4) anteriores, para reaccionar con una muestra recogida de un cuerpo vivo; y detectar una señal o señales del anticuerpo y/o del fragmento de anticuerpo que ha reaccionado.
- 60 (10) Un método para inducir apoptosis en células tumorales, que comprende: permitir que al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior, el fragmento de
- 65

anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior y el complejo de acuerdo con los apartados (3) o (4) anteriores, reaccione con una muestra recogida de un cuerpo vivo; y detectar una señal o señales del anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo que ha reaccionado.

En la presente memoria, en el método de tratamiento de acuerdo con el apartado (8) anterior, el método de detección de acuerdo con el apartado (9) anterior y el método de inducción de apoptosis de acuerdo con el apartado (10) anterior, el tumor es al menos un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en de cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de páncreas humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neuroblastoma humano.

(11) Un kit para tratar, diagnosticar o detectar un tumor, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior y el complejo de acuerdo con los apartados (3) o (4) anteriores.

(12) Un kit para inducir apoptosis en células tumorales, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con el apartado (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con el apartado (2) anterior y el complejo de acuerdo con los apartados (3) o (4) anteriores.

En la presente memoria, en los kits de acuerdo con los apartados (11) y (12) anteriores, el tumor es al menos un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de páncreas humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neuroblastoma humano.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc (SEQ ID NO: 12) de la región variable de cadena H (cadena pesada) (VH) del clon de anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 de ratón BA-1-3D y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma (SEQ ID NO: 13). El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y los péptidos señal (péptidos que consisten en 19 aminoácidos del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos putativa) se describen en cursiva. La glutamina (Q) con doble subrayado representa el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro de la VH de BA-1-3D. La secuencia de nucleótidos del ADNc del péptido maduro de BA-1-3D VH es que se muestra en la SEQ ID NO: 14, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 15. Se proporcionaron las secuencias de CDR (subrayadas) de acuerdo con la definición de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación NIH N.º 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., 1991) Las secuencias de aminoácidos de CDR1 (DYAMH), CDR2 (VISTYYGNTNYNQKFKG) y CDR3 (GGLREYYAMDY) de la VH de BA-1-3D son como se muestran en las SEQ ID NOS: 16 a 18, respectivamente. La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc (SEQ ID NO: 19) de la región variable de cadena L (cadena ligera) (VL) del clon de anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 de ratón BA-1-3D y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma (SEQ ID NO: 20). El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y los péptidos señal (péptidos que consisten en 20 aminoácidos del extremo N de la secuencia de aminoácidos putativa) se describen en cursiva. El ácido aspártico con doble subrayado (D) representa el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro de BA-1-3D VL. La secuencia de nucleótidos del ADNc del péptido maduro de BA-1-3D VL es que se muestra en la SEQ ID NO: 21, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 22. Se proporcionaron las secuencias de CDR (subrayadas). de acuerdo con la definición de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación NIH N.º 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR1 (KSSQSLNSSNQKNYLA), CDR2 (FASTRES) y CDR3 (QQHYSTPPT) de la VL de BA-1-3D son como se muestran en las SEQ ID NO: 23 a 25, respectivamente.

La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 26) y la secuencia de aminoácidos de un gen de BA-1-3D VH que se ha diseñado de manera que se intercala entre un sitio Spel (ACTAGT; subrayado) y un sitio HindIII (AAGCTT subrayado). La secuencia de nucleótidos descrita en cursiva (22 nucleótidos en el lado del extremo 3' terminal que incluye el sitio HindIII) indica una secuencia del intrón. Aparte de esto, la Figura 3 es la misma que se describe en la Figura 1.

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 27) y la secuencia de aminoácidos de un gen de BA-1-3D VL que se ha diseñado de manera que se intercala entre un sitio NheI (GCTAGC; subrayado) y un sitio EcoRI (GAATTC) subrayado). La secuencia de nucleótidos descrita en cursiva (22 nucleótidos en el lado 3' terminal que incluye el sitio EcoRI) indica una secuencia de intrón. Aparte de estos, la Figura 4 es la misma que se describe en la Figura 2.

La Figura 5 es una vista esquemática que muestra las estructuras de un vector de expresión para anticuerpos contra IgGα/k BA-1-3D quiméricos y humanizados. En el sentido de las agujas del reloj a partir del sitio de la enzima de restricción para Sall, dicho vector de expresión comprende una unidad de traducción de la cadena H partiendo de un promotor temprano inmediato principal de citomegalovirus humano (CMV) y un potenciador (promotor de CMV) utilizado para el comienzo de la transcripción de un gen de la cadena H del anticuerpo. Al promotor de CMV le sigue un exón de VH, los exones de CH1, una región bisagra, CH2 y CH3, e intrones intercalados entre los exones, y después del exón CH3, se liga una secuencia de poliadenilación. Después de la secuencia del gen de la cadena H, el vector comprende una unidad de traducción de cadena L que comienza con un promotor de CMV, un exón de VL, una parte de intrón y a continuación el exón de una región constante de la cadena κ humana (CL) y una secuencia de poliadenilación. A continuación, al gen de la cadena L le sigue un segmento que comprende un promotor temprano de SV40 (promotor de SV40), un gen de la xantina guanina

fosforribosil transferasa (*gpt*) de *E. coli* y el sitio de poliadenilación de SV40 (sitio poli(A) de SV40). Finalmente, el plásmido tiene una parte de un plásmido pUC19 que comprende el origen de replicación (ori pUC) y un gen de la β -lactamasa de *E. coli*.

La Figura 6 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de, BA-1-3D VH, dos tipos de BA-1-3D VH humanizado (HuBA-1-3D VH1 y HuBA-1-3D VH2) y U00503 VH como un aceptor. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y el número indicado encima de cada secuencia se colocó de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991). Los subrayados en la secuencia de aminoácidos de la VH de BA-1-3D indican secuencias de CDR tal como se determina de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991) (DYAMH, VISTYYGNTNYNQKFKG y GGLREYYAMDY). Los subrayados en las secuencias de aminoácidos de HuBA-1-3D VH1 y HuBA-1-3D VH2 indican restos de aminoácidos que conservan los restos de aminoácidos en la misma posición en la secuencia de aminoácidos de la correspondiente BA-1-3D VH de ratón, y se supone que estos restos de aminoácidos son importantes para la formación de las estructuras de las CDR. Las secuencias de CDR de U00503 VH no se muestran en la figura.

Debe observarse que la secuencia de aminoácidos de la BA-1-3D VH en la figura es que se muestra en la SEQ ID NO: 15 (una secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia es que se muestra en la SEQ ID NO: 14), la secuencia de aminoácidos de HuBA-1-3D VH1 en la figura es que se muestra en la SEQ ID NO: 35 (una secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia es que se muestra en la SEQ ID NO: 34), la secuencia de aminoácidos de HuBA-1-3D VH2 en la figura es que se muestra en la SEQ ID NO: 40 (una secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia es que se muestra en la SEQ ID NO: 39), y la secuencia de aminoácidos de U00503 VH en la figura es que se muestra en la SEQ ID NO: 29 (una secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia es que se muestra en la SEQ ID NO: 28).

La Figura 7 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de, BA-1-3D VL, BA-1-3D VL humanizado (HuBA-1-3D VL) y Z46622 VL como un aceptor. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y el número indicado encima de cada secuencia se colocó de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991). Los subrayados en la secuencia de aminoácidos de BA-1-3D VL indican secuencias de CDR como se determina de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991) (KSSQSLNNSNSNQKNYLA, FASTRES y QQHYSTPPT). El subrayado en la secuencia de aminoácidos de HuBA-1-3D VL indica el resto de aminoácido que conserva el resto de aminoácido en la misma posición en la secuencia de aminoácidos de la correspondiente BA-1-3D VL de ratón, y este resto de aminoácido se supone que es importante para la formación de las estructuras de las CDR. Las secuencias de CDR de la VL de Z46622 VL no se muestran en la figura.

Debe observarse que la secuencia de aminoácidos de BA-1-3D VL en la figura es que se muestra en la SEQ ID NO: 22 (una secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia es que se muestra en la SEQ ID NO: 21), el aminoácido la secuencia de HuBA-1-3D VL en la figura es que se muestra en la SEQ ID NO: 45 (una secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia es que se muestra en la SEQ ID NO: 44), y la secuencia de aminoácidos de Z46622 VL en la figura es que se muestra en la SEQ ID NO: 31 (una secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia es que se muestra en la SEQ ID NO: 30).

La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 36) y la secuencia de aminoácidos de un gen HuBA-1-3D VH1 que se ha diseñado de manera que está intercalado entre un sitio Spel (ACTAGT; subrayado) y un sitio HindIII (AAGCTT subrayado). La secuencia de nucleótidos descrita en cursiva (23 nucleótidos en el lado del extremo 3' que incluye el sitio HindIII) indica una secuencia del intrón.

La secuencia de nucleótidos del ADNc de HuBA-1-3D VH1 es que se muestra en la SEQ ID NO: 32, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 33. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y los péptidos señal (péptidos que consisten en 19 aminoácidos del extremo N terminal de la secuencia de aminoácidos putativa) se describen en cursiva. La glutamina (Q) con doble subrayado representa el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro de HuBA-1-3D VH1. La secuencia de nucleótidos del ADNc del péptido maduro de HuBA-1-3D VH1 es que se muestra en la SEQ ID NO: 34, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 35. Se proporcionaron las secuencias de CDR (subrayadas) de acuerdo con la definición de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación NIH N.º 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR1 (DYAMH), CDR2 (VISTYYGNTNYNQKFKG) y CDR3 (GGLREYYAMDY) de HuBA-1-3D VH1 son como se muestran en las SEQ ID NO: 16 a 18, respectivamente.

La Figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 41) y la secuencia de aminoácidos de un gen HuBA-1-3D VH2 que se ha diseñado de manera que se intercala entre un sitio Spel (ACTAGT; subrayado) y un sitio HindIII (AAGCTT; subrayado). La secuencia de nucleótidos descrita en cursiva (23 nucleótidos en el lado del extremo 3' terminal que incluye el sitio HindIII) indica una secuencia del intrón.

La secuencia de nucleótidos del ADNc de HuBA-1-3D VH2 es que se muestra en la SEQ ID NO: 37, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 38. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y los péptidos señal (péptidos que consisten en 19 aminoácidos del extremo N terminal de la secuencia de aminoácidos putativa) se describen en cursiva. La glutamina (Q) con doble subrayado representa el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro de HuBA-1-3D VH2. La secuencia de nucleótidos del ADNc del péptido maduro de HuBA-1-3D VH2 es que se muestra en la SEQ ID NO: 39, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 40. Se proporcionaron las secuencias de CDR (subrayadas) de acuerdo con la definición de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación NIH N.º 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., 1991) Las secuencias de aminoácidos de CDR1 (DYAMH), CDR2

(VISTYYGNTNYNQKFKG) y CDR3 (GGLREYYAMDY) de HuBA-1-3D VH2 son como se muestran en las SEQ ID NOS: 16 a 18, respectivamente.

La Figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 46) y la secuencia de aminoácidos de un gen HuBA-1-3D VL que se ha diseñado de manera que está intercalado entre un sitio NheI (GCTAGC; subrayado) y un sitio EcoRI (GAATTC) subrayado. La secuencia de nucleótidos descrita en cursiva (23 nucleótidos en el lado 3' terminal que incluye el sitio EcoRI) indica una secuencia de intrón.

La secuencia de nucleótidos del ADNc de HuBA-1-3D VL es que se muestra en la SEQ ID NO: 42, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 43. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y los péptidos señal (péptidos que consisten en 20 aminoácidos del extremo N terminal de la secuencia de aminoácidos putativa) se describen en cursiva. El ácido aspártico (D) con doble subrayado representa el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro de HuBA-1-3D VL. La secuencia de nucleótidos del ADNc del péptido maduro de HuBA-1-3D VL es que se muestra en la SEQ ID NO: 44, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 45. Se proporcionaron las secuencias de CDR (subrayadas) de acuerdo con la definición de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación NIH N.º 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR1 (KSSQSLNSSLNQNKYLA), CDR2 (FASTRES) y CDR3 (QQHYSTPPT) de HuBA-1-3D VL son como se muestran en las SEQ ID NO: 23 a 25, respectivamente.

La Figura 11 muestra las secuencias de nucleótidos de los cebadores de oligonucleótidos (CMV2, JNT026, JNT082, JNT097 y JNT098), que se usaron en la amplificación por PCR de los ADNc de la cadena H y la cadena L y las reacciones de secuencia en los Ejemplos 4 de la presente solicitud. Las secuencias de nucleótidos de CMV2, JNT026, JNT082, JNT097 y JNT098 son como se muestran en las SEQ ID NO: 47 a 51, respectivamente.

La Figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 52) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 53) de la región codificante de la cadena H (cadena γ 1) de un vector pChBA-1-3D. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y la posición de un codón de terminación se indica con el símbolo "*".

La Figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 54) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 55) de la región codificante de la cadena L (cadena κ) de un vector pChBA-1-3D. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y la posición de un codón de terminación se indica con el símbolo "*".

La Figura 14 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 56) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 57) de la región codificante de la cadena H (cadena γ 1) de un vector pHuBA-1-3D-1. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y la posición de un codón de terminación se indica con el símbolo "*".

La Figura 15 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 58) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 59) de la región codificante de la cadena H (cadena γ 1) de un vector pHuBA-1-3D-2. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y la posición de un codón de terminación se indica con el símbolo "*".

La Figura 16 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 60) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 61) de la región codificante de la cadena L (cadena κ) en cada uno de un vector pHuBA-1-3D-1, un vector pHuBA-1-3D-2, un vector pHuBA-1-3D-1-T73K y un vector pHuBA-1-3D-1-A24G/T73K. En resumen, las cadenas L (cadenas κ) de los anticuerpos HuBA-1-3D-1, HuBA-1-3D-2, HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K tienen la misma secuencia de nucleótidos y la misma secuencia de aminoácidos. En la figura, cada aminoácido se indica con una sola letra, y la posición de un codón de terminación se indica con el símbolo "*".

La Figura 17 muestra la SDS-PAGE realizada en los anticuerpos purificados (carril 1: marcador de peso molecular (Patrón preteñido SeeBluePlus2 (Invitrogen)), carril 2: ChBA-1-3D, carril 3: HuBA-1-3D-1, carril 4: HuBA-1-3D-2, carril 5: HuBA-1-3D-1-T73K, y carril 6: HuBA-1-3D-1-A24G/T73K). La figura muestra los resultados obtenidos aplicando 7,5 μ g de cada anticuerpo en gel NuPAGE Bis-Tris al 4 %-20 % en condiciones reducidas usando un tampón de migración MES-SDS (Invitrogen). Los valores numéricos en el lado izquierdo de la figura indican pesos moleculares.

La Figura 18 muestra los resultados del ELISA con respecto a la actividad de unión de una proteína recombinante (hDlk-1-His) en la región extracelular de hDlk-1 a ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2. Se recubrió una placa de ELISA con cada uno de 1 μ g/ml de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2. A continuación, se produjo una serie de dilución de hDlk-1-His (diluida 2 veces a partir de 1 μ g/ml), y a continuación se añadieron a la placa antes mencionada para la reacción. La unión de hDlk-1-His se detectó con un anticuerpo anti-etiqueta His con HRP.

La Figura 19 muestra los resultados del ELISA con respecto a la actividad de unión de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 a hDlk-1-His. Se recubrió una placa de ELISA con 0,5 μ g/ml de hDlk-1-His. a continuación, se produjo una serie de dilución de los anticuerpos de prueba (ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2) (diluida en 2 veces a partir de 5 μ g/ml), y a continuación se añadieron a la placa antes mencionada para la reacción. Los valores CE_{50} de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 se muestran en la figura.

La Figura 20 muestra los resultados del ELISA con respecto a la actividad de unión de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 a hDlk-1-His. Se recubrió una placa de ELISA con 0,05 μ g/ml de hDlk-1-His. A continuación, se produjo una serie de dilución de los anticuerpos de prueba (ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2) (diluida en 2 veces a partir de 5 μ g/ml), y a continuación se añadieron a la placa antes mencionada para la reacción.

La Figura 21 muestra los resultados de ELISA con respecto a la actividad de unión de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-2, HuVH/MuVL (en la que la VL de HuBA-1-3D-2 (HuBA-1-3D VL) fue sustituida con la VL de BA-1-3D de ratón) y MuVH/HuVL (en el que la VH de HuBA-1-3D-2 (HuBA-1-3D VH2) fue sustituida por la VH de BA-1-3D de ratón) con hDlk-1-His. Se recubrió una placa de ELISA con 0,05 μ g/ml de hDlk-1-His. A continuación, se produjo una serie de dilución de 2 veces de un sobrenadante de cultivo de células, en el que cada uno de los anticuerpos de

prueba (ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-2, HuVH/MuVL y MuVH/HuVL) se habían expresado transitoriamente y a continuación se añadieron a la placa antes mencionada para la reacción.

La Figura 22 muestra las secuencias de aminoácidos de HuBA-1-3D VH1 y los mutantes de sustitución de aminoácidos de las mismas (V5Q a T73K/T75S). El aminoácido está indicado con una sola letra. En cada mutante de sustitución de aminoácidos, los mismos aminoácidos que los de HuBA-1-3D VH1 se indican con el símbolo “-”, y solo los aminoácidos sustituidos se indican con letras simples. El número encima de cada secuencia indica un número de aminoácido (Kabat et al., 1991).

La Figura 23 muestra los resultados del ELISA con respecto a la actividad de unión de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1, HuBA-1-3D-1-A24G, HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K con hDlk-1-His. Se recubrió una placa de ELISA con 0,05 µg/ml de hDlk-1-His. A continuación, se produjo una serie de 2 veces de un sobrenadante de cultivo de células, en el que cada uno de los anticuerpos de prueba (ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1, HuBA-1-3D-1-A24G, HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K) se habían expresado transitoriamente, y a continuación se añadieron a la placa antes mencionada para la reacción.

La Figura 24 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 62) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 63) de la región codificante de la cadena H (cadena γ1) de pHuBA-1-3D-1-T73K. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y la posición de un codón de terminación se indica con el símbolo “*”.

En la presente memoria, la secuencia de nucleótidos de ADNc (SEQ ID NO: 70) de la región variable de la cadena H (VH) de HuBA-1-3D-1-T73K es una secuencia que comprende nucleótidos en las posiciones 1 a 420 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ. ID NO: 62, y la secuencia de aminoácidos putativa (SEQ ID NO: 71) de la VH de HuBA-1-3D-1-T73K es una secuencia que comprende aminoácidos en las posiciones 1 a 140 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 63. En la secuencia de aminoácidos putativa antes mencionada (SEQ ID NO: 71) de la VH de HuBA-1-3D-1-T73K, los péptidos que consisten en 19 aminoácidos del extremo N terminal son péptidos señal. La secuencia de nucleótidos del ADNc de un péptido maduro de HuBA-1-3D-1-T73K VH es que se muestra en la SEQ ID NO: 72, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 73.

La Figura 25 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 64) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 65) de la región codificante de la cadena H (cadena γ1) de pHuBA-1-3D-1-A24G/T73K. El resto de aminoácido se indica con una sola letra, y la posición de un codón de terminación se indica con el símbolo “*”.

En la presente memoria, la secuencia de nucleótidos del ADNc (SEQ ID NO: 74) de la región variable de la cadena H (VH) de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K es una secuencia que comprende nucleótidos en las posiciones 1 a 420 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 64, y la secuencia de aminoácidos putativa (SEQ ID NO: 75) de la VH de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K es una secuencia que comprende aminoácidos en las posiciones 1 a 140 en la secuencia de aminoácidos tal que se muestra en la SEQ ID NO: 65. En la secuencia de aminoácidos putativa antes mencionada (SEQ ID NO: 75) de la VH de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K, los péptidos que consisten en 19 aminoácidos del extremo N terminal son péptidos señal. La secuencia de nucleótidos del ADNc de un péptido maduro de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K es que se muestra en la SEQ ID NO: 76, y una secuencia de aminoácidos putativa de la misma es que se muestra en la SEQ ID NO: 77.

La Figura 26 muestra los resultados del ELISA con respecto a la actividad de unión de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1, HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K con hDlk-1-His. Se recubrió una placa de ELISA con 0,05 µg/ml de hDlk-1-His. A continuación, se produjo una serie de dilución de dos veces de los anticuerpos de prueba a partir de 5 µg/ml, y a continuación se añadieron a la placa antes mencionada para la reacción.

La Figura 27 muestra la estabilidad de la actividad de unión al antígeno de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en una formulación líquida. HuBA-1-3D-1-A24G/T73K se conservó en formulación líquida con diversos valores de pH a 40 °C durante 1 mes, y la actividad de unión del mismo se examinó a continuación mediante citometría de flujo y ELISA inmovilizado con antígeno. Se usó un anticuerpo que se había conservado en formulación líquida con diversos valores de pH a -80 °C como producto de patrón de actividad.

Figura 27 (A): Usando 293 células que expresan constantemente hDlk-1, la actividad de unión al antígeno del anticuerpo se midió por citometría de flujo. El eje vertical indica un valor medio de intensidad fluorescente (MFI: fluorointensidad media), y el eje horizontal indica la concentración de anticuerpo.

Figura 27 (B): Usando un ELISA inmovilizado con antígeno recubierto con hDlk-1-His, se examinó la actividad de unión al antígeno. El eje vertical indica la absorbancia, y el eje horizontal indica la concentración de anticuerpo.

La Figura 28 muestra los resultados obtenidos mediante el análisis de la estabilidad de la actividad de unión al antígeno de un anticuerpo en plasma de mono cinomolgo. HuBA-1-3D-1-A24G/T73K se conservó a 37 °C en plasma de mono cinomolgo durante un período de incubación indicado en la figura. A continuación, se examinó la actividad de unión al antígeno del anticuerpo usando ELISA inmovilizado con antígeno recubierto con hDlk-1-His. El eje vertical indica el porcentaje de la actividad de unión al antígeno (valor de absorbancia) después de cada período de incubación, cuando el porcentaje de la actividad de unión al antígeno a las 0 h se define como 100 %. El eje horizontal indica el período de incubación.

La Figura 29 muestra la actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en modelos de tratamiento con xenoinjerto que usan células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano.

La Figura 29A muestra la formación de tumores a lo largo del tiempo en un grupo control (●: PBS) y en grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (○: 1 mg/kg, Δ: 5 mg/kg, □: 10 mg/kg) (un valor medio ± desviación estándar). Las puntas de flecha en el eje horizontal indican los puntos temporales a los que se administró el anticuerpo. En todos los grupos de administración de anticuerpos, se observaron efectos antitumorales significativos (P <0,01 (mediante la prueba t de Student)) después del 13.º día (día 13) en comparación con el grupo control.

La Figura 29B muestra el peso del tumor trazado de cada ratón en el momento del 23.º día (Día 23) (el último día del experimento) en la prueba de la Figura 29A. **P < 0,01 (según la prueba t de Student).

La Figura 30 muestra la actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en modelos de tratamiento de xenoinjerto que usan células de neuroblastoma humano SK-N-F1.

5 La Figura 30A muestra la formación de tumores a lo largo del tiempo en un grupo control (●: PBS) y en grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (○: 1 mg/kg, Δ: 5 mg/kg, □: 10 mg/kg) (un valor medio ± desviación estándar). Las puntas de flecha en el eje horizontal indican los puntos temporales a los que se administró el anticuerpo. *P < 0,05, **P < 0,01 (según la prueba t de Student).

10 La Figura 30B muestra el peso tumoral trazado de cada ratón en el momento del 34.º día (día 34) (el último día del experimento) en la prueba de la Figura 30A. **P < 0,01 (según la prueba t de Student).

La Figura 31 muestra las actividades antitumorales de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K y Nexavar en modelos de tratamiento con xenoinjerto que usan células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano.

15 La Figura 31A muestra un cambio en el tiempo en los volúmenes tumorales de un grupo control (●: PBS) y grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (○: 0,1 mg/kg, Δ: 0,5 mg/kg, □: 1 mg/kg) (un valor medio ± desviación estándar). Las puntas de flecha en el eje horizontal indican la administración del anticuerpo. **P < 0,01 (según la prueba t de Student).

20 La Figura 31B muestra un cambio a lo largo del tiempo en los volúmenes tumorales de un grupo control (●: PBS) y grupos de administración de Nexavar (○: 40 mg/kg, Δ: 80 mg/kg) (un valor medio ± desviación estándar). Las puntas de flecha en el eje horizontal indican los puntos temporales a los que se administró Nexavar. *P < 0,05 (según la prueba t de Student).

La Figura 31C muestra un cambio en el tiempo en los pesos corporales de los ratones en los experimentos A y B. Tal cambio en los pesos corporales se muestra como el porcentaje del peso corporal en cada día de medición, cuando el peso corporal de cada ratón en el momento de la división en grupos se define al 100 % (un valor medio ± desviación estándar). *P < 0,05, **P < 0,01 (según la prueba t de Student).

25 La Figura 32 muestra la actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en modelos de tratamiento con xenoinjerto que usan células HepG2/C3A de carcinoma hepatocelular humano.

30 La Figura 32A muestra un cambio a lo largo del tiempo en los volúmenes tumorales de un grupo control (●: PBS) y grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (○: 0,1 mg/kg, Δ: 0,5 mg/kg, □: 1 mg/kg, ◇: 5 mg/kg) (un valor medio ± desviación estándar). Las puntas de flecha en el eje horizontal indican la administración del anticuerpo. **P < 0,01 (según la prueba t de Student).

La Figura 32B muestra el peso del tumor trazado de cada ratón en el momento del 26.º día (día 26) (el día final del experimento) en la prueba de la Figura 32A. **P < 0,01 (según la prueba t de Student).

La Figura 33 muestra la actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en modelos de tratamiento de xenoinjerto que usan células de cáncer de pulmón microcítico humano Lu-135.

35 La Figura 33A muestra un cambio en el tiempo en los volúmenes tumorales de un grupo control (●: PBS) y grupos de administración HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (○: 1 mg/kg, Δ: 10 mg/kg) (un valor medio ± desviación estándar). Las puntas de flecha en el eje horizontal indican la administración del anticuerpo. **P < 0,05 (según la prueba t de Student).

40 La Figura 33B muestra el peso del tumor trazado de cada ratón en el momento del 34.º día (día 34) (el día final del experimento) en la prueba de la Figura 33A. **P < 0,05 (según la prueba t de Student).

La Figura 34 muestra fotografías en las que se detectó muerte celular causada por apoptosis en los cortes congelados de tumores de xenoinjerto después de la administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K a modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano.

45 La Figura 34A muestra fotografías en las que se detectó muerte celular causada por apoptosis mediante tinción de TUNEL. Desde la izquierda, las fotografías muestran imágenes teñidas 48 horas después de la administración de PBS, 24 horas después de la administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (5 mg/kg) y 48 horas después de la administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (5 mg/kg), respectivamente. Las células cancerosas en las que se observó tinción nuclear marrón oscuro indican células apoptóticas positivas para TUNEL (la lente objetivo de un microscopio: 400 veces).

50 La Figura 34B muestra fotografías en las que se detectó muerte celular causada por apoptosis mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-caspasa-3 escindido. Desde la izquierda, las fotografías muestran imágenes teñidas 48 horas después de la administración de PBS, 24 horas después de la administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (5 mg/kg) y 48 horas después de la administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (5 mg/kg), respectivamente. Las células cancerosas cuyo citoplasma se tiñó en marrón oscuro indican células apoptóticas activas con caspasa-3 positivo (la lente objetivo de un microscopio: 400 veces).

Descripción detallada de la invención

60 En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle. No se pretende que las siguientes descripciones limiten el alcance de la presente invención. Aparte de los siguientes ejemplos, la presente invención se puede modificar y se puede llevar a cabo, según sea apropiado, dentro de un rango que no perjudique el propósito de la presente invención.

65 La presente memoria descriptiva incluye todos los contenidos divulgados en la memoria descriptiva de la Solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N.º 61/709.282 (presentada el 3 de octubre de 2012), que es un documento de prioridad de la presente solicitud. Además, todas las publicaciones citadas en la presente memoria

descriptiva, que incluyen documentos de la técnica anterior y documentos de patente tales como publicaciones de solicitudes abiertas a consulta pública y publicaciones de patentes, se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

5 1. Sumario de la presente invención

Como se describió anteriormente, la Dlk-1 humana (homólogo de tipo delta 1 (*Drosophila*); hDlk-1) es una proteína transmembrana de tipo I (de tipo transmembrana uno) con una longitud total de 383 restos de aminoácidos y esta proteína tiene 6 motivos de tipo EGF en su región extracelular. Se sabe que un gen hDlk-1 y un producto génico del mismo se expresan con una alta frecuencia en diversos tipos de células cancerosas o tumorales. En general, es difícil de preparar y obtener un anticuerpo que exhiba actividad antitumoral *in vivo*. Por lo tanto, incluso si se produce un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1, este tiene actividad antitumoral *in vitro* pero no exhibe la actividad *in vivo* en muchos casos. Por otra parte, no se han aclarado el dominio funcional de hDlk-1 que actúa sobre el crecimiento de células cancerosas, un ligando (o un receptor) de hDlk-1, su ruta de transducción de la señal intracelular y similares. Por lo tanto, es sustancialmente imposible producir eficazmente un anticuerpo limitando su diana. En tales circunstancias, en la presente invención, se ha obtenido con éxito un clon que tiene actividad antitumoral *in vivo* seleccionándolo a partir de un gran número de clones.

En primer lugar, basándose en la inmunohistoquímica que utiliza anticuerpos anti-hDlk-1 conocidos, los autores de la presente invención han descubierto que hDlk-1 se expresa en el cáncer de colon, el cáncer de mama y el cáncer de páncreas, además de los cánceres y las células tumorales mencionados anteriormente, en los que se había confirmado previamente la expresión de hDlk-1.

A continuación, los autores de la presente invención han producido recientemente aproximadamente 100 clones de anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 con el fin de producir anticuerpos anti-hDlk-1 capaces de destruir las células cancerosas que expresan hDlk-1 a nivel individual o inhibir el crecimiento del tumor, concretamente, anticuerpos anti-hDlk-1 que tienen actividad antitumoral *in vivo*. Posteriormente, los autores de la presente invención han evaluado los efectos farmacéuticos *in vivo* (acción anti-tumoral) de estos clones, utilizando ratones portadores de tumores establecidos mediante el trasplante de varios tipos de líneas celulares de cáncer por vía subcutánea en ratones atímicos. Como resultado, los autores de la presente invención han logrado obtener varios clones que exhiben una actividad de inhibición del crecimiento tumoral significativa (nombre del clon: BA-1-3D, DI-2-14, 2-13, DI-6 y M3-1).

Por otra parte, entre los anticuerpos anti-hDlk-1 anteriormente mencionados, los autores de la presente invención han descubierto un anticuerpo que exhibe una actividad antitumoral significativa en modelos de tratamiento de ratón portadores de cáncer usando células de cáncer humano, cuando se administra solo, lo que sería importante para el desarrollo de un anticuerpo terapéutico contra el cáncer, y los inventores también han desarrollado un anticuerpo humanizado del mismo. Además, los presentes inventores han añadido una modificación específica (mutación de sustitución de aminoácido) a este anticuerpo anti-hDlk-1 humanizado, de modo que han obtenido un anticuerpo anti-hDlk-1 humanizado modificado que tiene una avidéz equivalente a la de un anticuerpo parental (BA-1-3D de ratón). Además, los inventores han demostrado que este anticuerpo anti-hDlk-1 humanizado modificado conserva una actividad estable de unión al antígeno durante un largo período de tiempo en una formulación líquida y en sangre o plasma de mono o humano, etc.

45 2. Preparación del anticuerpo anti-hDlk-1

(1) Preparación del antígeno

La información relativa a la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de hDlk-1 se divulga como "Número de acceso: NP_003827" en el sitio web del NCBI (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), por ejemplo. Además, la información referente a una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que codifica la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 se divulga como "Número de acceso: NM_003836" en el mismo sitio web anterior.

Como antígeno, se puede utilizar un polipéptido o péptido (al que a veces se puede hacer referencia simplemente como "péptido") que comprende al menos una porción de (toda o una parte de) la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 y preferiblemente, se puede utilizar un péptido que comprende al menos una porción de (toda o una parte de) la secuencia de aminoácidos de la región extracelular (FA-1) de hDlk-1. Como se indicó anteriormente, la región extracelular de hDlk-1 comprende 6 motivos de tipo EGF (EGF-1 a EGF-6). Esta región indica una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 24 a 244 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y, preferentemente, una región que consiste en los aminoácidos de la "posición 24" a las posiciones "248-285" (aproximadamente 225 a 262 restos de aminoácidos) en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

En la presente memoria, en el caso de un péptido utilizado como antígeno, la longitud de la "al menos una porción de la secuencia de aminoácidos" mencionada no está particularmente limitada. Por ejemplo, es preferible una región que comprende uno o dos o más de los 6 motivos de tipo EGF. Los ejemplos más preferibles incluyen una región que comprende EGF-1 y EGF-2 (es decir, una región que consiste en los aminoácidos de las posiciones 24 a 91 en

la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2), una región que comprende EGF-3 y EGF-4 (es decir, una región que consiste en los aminoácidos de las posiciones 92 a 167 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2) y una región que comprende EGF-4, EGF y EGF-5-6 (es decir, una región que consiste en los aminoácidos de las posiciones 131 a 244 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2).

5 Como método para preparar un péptido utilizado como antígeno, se puede aplicar ya sea una síntesis química, o una síntesis mediante medios de ingeniería genética utilizando *Escherichia coli* o similares. Se pueden aplicar métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

10 En el caso de realizar una síntesis química de péptidos, se puede sintetizar un péptido de este tipo por medio de métodos bien conocidos para la síntesis de péptidos. Como tal síntesis, se pueden aplicar un método de síntesis en fase sólida o un método de síntesis en fase líquida. Se pueden utilizar aparatos de síntesis de péptidos disponibles en el mercado (por ejemplo, PSSM-8, etc.; fabricado por Shimadzu Corp.).

15 En el caso de la síntesis de un péptido por medio de ingeniería genética, se diseña y sintetiza en primer lugar el ADN que codifica el péptido. El diseño y la síntesis del ADN pueden llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un método de PCR, usando un vector que comprende un gen hDlk-1 completo o similar como molde y también usando cebadores diseñados de tal manera que se pueda sintetizar una región de ADN deseada con los mismos. A continuación, el ADN sintetizado de este modo se liga a un vector adecuado para obtener un vector recombinante utilizado en la expresión de una proteína. Este vector recombinante se introduce a continuación en un hospedador de manera que se pueda expresar en el mismo dicho gen de interés, con el fin de obtener un transformante (Sambrook J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

25 Como vector, se pueden utilizar un fago o un plásmido susceptibles de replicación autónoma en microorganismos hospedadores. Adicionalmente, también se puede utilizar un vector de virus de animal o virus de insecto. Para la preparación de un vector recombinante, el ADN purificado se puede escindir con enzimas de restricción adecuadas, la porción de ADN obtenida se puede insertar a continuación en el sitio de restricción del ADN del vector adecuado, etc., y después se puede ligar a un vector. El tipo de un hospedador utilizado en la transformación no está particularmente limitado, siempre y cuando sea susceptible de expresar un gen de interés. Los ejemplos de tal hospedador incluyen bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), levaduras, células animales (células COS, células CHO, etc.), células de insectos e insectos. También es posible utilizar un mamífero tal como una cabra como un hospedador. Se conoce un método para introducir un vector recombinante en un hospedador.

35 El transformante anteriormente mencionado se cultiva y un péptido utilizado como antígeno se recoge a continuación del cultivo. El término "cultivo" se utiliza para significar uno cualquiera de (a) un sobrenadante de cultivo y (b) células cultivadas, una masa de células cultivadas, o un producto disgregado de las mismas.

40 Después de la finalización del cultivo, cuando se produce el péptido de interés en las células bacterianas (cuerpos bacterianos) o en las células, tales células bacterianas o células se disgregan y a continuación se extrae un péptido. Por otro lado, se produce un péptido de interés fuera de la célula bacteriana o de las células, la solución de cultivo se utiliza directamente, o las células bacterianas o las células se eliminan mediante centrifugación o similar. A continuación, se aplican por separado o combinados métodos bioquímicos comunes utilizados en el aislamiento y la purificación de péptidos, tales como precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, con el fin de aislar y purificar un péptido de interés.

50 En la presente invención, también se puede obtener un péptido utilizado como un antígeno mediante traducción *in vitro* utilizando un sistema de síntesis sin células. En este caso, se pueden aplicar dos tipos de métodos, concretamente, un método que utiliza ARN como molde y un método que utiliza ADN como molde (transcripción/traducción). Como tal sistema de síntesis sin células, se pueden utilizar sistemas comercializados, tales como el sistema Expressway™ (Invitrogen), PURESYSTEM (marca registrada; Post Genome Institute Co., Ltd.) y el sistema TNT (marca registrada; Promega).

55 El péptido obtenido de esta manera también puede estar unido a una proteína vehículo adecuada, tal como albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), tiroglobulina humana, o gammaglobulina de pollo.

60 Además, tal antígeno de este tipo puede ser un péptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o múltiples aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 (SEQ ID NO: 2) o la secuencia parcial anteriormente mencionada de la misma. Por ejemplo, también se puede utilizar un péptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una delección de uno o múltiples (preferiblemente uno o varios (por ejemplo de 1 a 10 y más preferiblemente de 1 a 5)) aminoácidos, una sustitución de uno o múltiples (preferiblemente uno o varios (por ejemplo de 1 a 10 y más preferiblemente de 1 a 5)) aminoácidos por otros aminoácidos, o una adición de uno o múltiples (preferiblemente uno o varios (por ejemplo de 1 a 10 y más preferiblemente 1 a 5)) aminoácidos, con respecto a la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 o una secuencia parcial de la misma.

En la presente invención, un ejemplo de un gen que se va a introducir en las células o similares es un gen que codifica una proteína hDlk-1, un fragmento parcial de la misma, una proteína mutante de la misma, o un fragmento de la misma. Como tal gen, se puede utilizar, por ejemplo, un gen que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia parcial de la misma.

Además, como tal gen que se va a introducir en las células o similar, también se puede utilizar una secuencia de nucleótidos, que hibrida con una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 en condiciones rigurosas y codifica una proteína que tiene actividad hDlk-1, o una secuencia parcial de la misma.

La expresión "condiciones rigurosas" se utiliza para referirse a las condiciones aplicadas al lavado después de la hibridación, que consisten en una concentración de sal (sodio) del tampón de entre 10 y 500 mM y una temperatura entre 42 °C y 72 °C y preferiblemente consisten en la concentración de sal de tampón anteriormente mencionada de entre 50 y 300 mM y una temperatura entre 55 °C y 68°C.

La mutación puede introducirse en un gen mediante métodos conocidos tales como un método Kunkel o un método de ADN dúplex discontinuo (Gapped Duplex), utilizando kits de introducción de mutación que utilizan mutagénesis dirigida al sitio, tales como GeneTailor™ Site Directed Mutagenesis System (fabricado por Invitrogen) o TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Prime STAR (marca registrada) Mutagenesis Basal Kit, Mutan-Super Express Km, etc.; fabricado por Takara Bio Inc.).

(2) Preparación del anticuerpo policlonal

El antígeno preparado se administra a un mamífero para la inmunización. El tipo de tal mamífero no está particularmente limitado. Los ejemplos de tal mamífero incluyen una rata, un ratón y un conejo. Entre otros, es preferible un ratón.

La dosis del antígeno por animal se puede determinar, según sea apropiado, dependiendo de la presencia o ausencia de un coadyuvante. Los ejemplos de tal coadyuvante incluyen coadyuvante completo de Freund (FCA), coadyuvante incompleto de Freund (FIA) y un coadyuvante de hidróxido de aluminio. La inmunización se puede llevar a cabo mediante la inyección del antígeno en la vena, la almohadilla plantar, el tejido subcutáneo, la cavidad abdominal, etc. Además, el intervalo de inmunización no está particularmente limitado. La inmunización se lleva a cabo de 1 a 10 veces y preferiblemente 2 o 3 veces, a intervalos de varios días a varias semanas y preferiblemente a intervalos de 1 semana. De tres a siete días después de la inmunización final, se mide el título de anticuerpo por medio de inmunoensayo enzimático (ELISA o EIA), radioinmunoensayo (RIA), etc. El día en el que se obtiene un título de anticuerpos deseado, se extrae sangre y a continuación se obtiene el antisero. En el caso en el que un anticuerpo se debe purificar con el método mencionado anteriormente para recoger el anticuerpo, se selecciona apropiadamente un método adecuado entre los métodos conocidos tales como un método de precipitación con sal de sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad, o estos métodos se pueden utilizar combinados, para purificar el anticuerpo. A continuación, la reactividad de un anticuerpo policlonal contenido en el antisero se mide mediante ELISA, etc.

(3) Preparación del anticuerpo monoclonal

(3-1) Recogida de las células productoras de anticuerpos

El tipo del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención no está limitado. Es preferible un anticuerpo monoclonal.

El antígeno preparado se administra a un mamífero tal como una rata, un ratón o un conejo para la inmunización. La dosis del antígeno por animal se puede determinar, según sea apropiado, dependiendo de la presencia o ausencia de un coadyuvante. En la presente memoria se utilizan los mismos coadyuvantes que se han descrito anteriormente. Asimismo, en la presente memoria se aplican los mismos métodos de inmunización que se han descrito anteriormente. De uno a sesenta días, y preferiblemente de uno a catorce días después de la inmunización final, se recogen las células productoras de anticuerpos. Los ejemplos de tales células productoras de anticuerpos incluyen células de bazo, células de ganglios linfáticos y células de sangre periférica. Entre otras, son preferibles las células de los ganglios linfáticos y las células de bazo.

(3-2) Fusión celular

Con el fin de obtener un hibridoma (una línea celular productora de anticuerpos), la fusión celular se lleva a cabo entre las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma. Como células de mieloma que se van a fusionar con las células productoras de anticuerpos, fácilmente disponibles, se pueden utilizar líneas celulares establecidas, tales como las líneas de células de animales tales como ratones. En cuanto a las líneas celulares disponibles, son preferibles aquellas que tienen selectividad por fármacos, no pueden sobrevivir en un medio selectivo HAT (que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina) cuando están en un estado no fusionado y pueden sobrevivir en el mismo solo cuando se fusionan con células productoras de anticuerpos.

Los ejemplos de las células de mieloma utilizadas en la presente memoria incluyen líneas celulares de mieloma de ratón tales como P3-X63-Ag8.653, P3-X63-Ag8(X63), P3-X63-Ag8.U1(P3U1), P3/NS I/1-Ag4-1(NS1) y Sp2/0-Ag14(Sp2/0). Tales células de mieloma se pueden seleccionar, siempre que se tenga en consideración la compatibilidad con las células productoras de anticuerpos, según sea apropiado.

5 Posteriormente, las células de mieloma se fusionan con las células productoras de anticuerpo para la fusión celular. Para este tipo de fusión celular, las células productoras de anticuerpos a una densidad celular de 1×10^6 a 1×10^7 células/ml se mezclan con células de mieloma a una densidad celular de 2×10^5 a 2×10^6 células/ml, en un medio utilizado para células animales que no contiene suero, tal como DMEM o un medio RPMI-1640. La proporción de células entre dichas células productoras de anticuerpos y tales células de mieloma (células productoras de anticuerpos:células de mieloma) no está limitada. En general, tal proporción celular se encuentra preferiblemente entre 1:1 y 10:1 y más preferiblemente 3:1. Posteriormente, se lleva a cabo una reacción de fusión en presencia de un promotor de la fusión celular. En cuanto a tal promotor de la fusión celular. Como promotor de la fusión celular se puede utilizar polietilenglicol que tiene un peso molecular medio entre 1.000 y 6.000 dalton (D) o similares, por ejemplo. Además, las células productoras de anticuerpos se pueden fusionar con células de mieloma usando un dispositivo de fusión celular comercializado que utiliza la estimulación eléctrica (p. ej., electroporación).

(3-3) Selección del hibridoma y clonación

20 Un hibridoma de interés se selecciona a partir de células obtenidas después del tratamiento de fusión celular. Como método de selección, una suspensión de células se diluye con un medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal o similar, según sea apropiado y la solución diluida se dispersa a continuación en una placa de microtitulación. Se añade un medio selectivo a cada pocillo y se lleva a cabo el cultivo a continuación, mientras que el medio selectivo se cambia apropiadamente por uno fresco. Como resultado, las células que crecen aproximadamente 14 días después del comienzo del cultivo en el medio selectivo pueden obtenerse en forma de hibridomas.

30 Posteriormente, se analiza la presencia o ausencia de un anticuerpo contra hDlk-1 en un sobrenadante de cultivo de los hibridomas en crecimiento. Dicha selección de los hibridomas se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos ordinarios y por lo tanto el tipo del método de selección no está particularmente limitado. Por ejemplo, una porción del sobrenadante del cultivo de los hibridomas en crecimiento contenidos en el pocillo se puede recoger y tales hibridomas se pueden seleccionar a continuación mediante ELISA, EIA, RIA, etc.

35 Las células fusionadas se pueden clonar mediante dilución limitante o similar. Un anticuerpo que presenta una fuerte reactividad con hDlk-1 se determina por medio de citometría de flujo o similar, y se selecciona y un hibridoma que produce el anticuerpo se establece como clon.

(3-4) Recogida del anticuerpo monoclonal

40 Como método de cultivo de los hibridomas establecidos y posterior recogida del anticuerpo monoclonal a partir del cultivo obtenido, se puede adoptar un método de cultivo celular común, un método de formación de ascitis, etc. El término "cultivo" se utiliza para indicar que se permite desarrollar un hibridoma en una placa de cultivo o botella de cultivo, o que se permite que prolifere un hibridoma en la cavidad abdominal de un animal, como se describe a continuación.

45 En el método de cultivo celular, los hibridomas se pueden cultivar en un medio de cultivo celular animal tal como un medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal al 10 %, un medio MEM o un medio sin suero en condiciones de cultivo comunes (p. ej., 37 °C, concentración de CO₂ al 5 %) durante 7 a 14 días y a continuación se puede obtener un anticuerpo del sobrenadante del cultivo.

50 En el método de formación de ascitis, los hibridomas se administran a una densidad celular de aproximadamente 1×10^7 células en la cavidad abdominal de un animal de la misma especie que el mamífero del que derivan las células de mieloma, con el fin de provocar la proliferación de una gran cantidad de hibridomas. A continuación, la ascitis se recoge preferiblemente de 2 a 3 semanas más tarde.

55 En el caso en el que un anticuerpo debe ser purificado en el método anteriormente mencionado para recoger el anticuerpo, un método adecuado se selecciona apropiadamente a partir de métodos conocidos, tales como un método de precipitación con sal sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel y cromatografía de afinidad, o estos métodos se utilizan combinados, con el fin de purificar el anticuerpo anteriormente mencionado.

60 (3-5) Selección del clon que tiene actividad antitumoral

El anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención es un anticuerpo que tiene actividad antitumoral *in vivo*.

65 En la presente memoria, la expresión "actividad antitumoral" se utiliza para indicar la actividad de destrucción de células tumorales (células cancerosas) o la inhibición del crecimiento tumoral. En la presente invención, como tal

actividad antitumoral es preferible, por ejemplo, la actividad de inhibición de la angiogénesis tumoral. Por otra parte, los tipos de tumores humanos (células tumorales), sobre los que el anticuerpo de la presente invención es capaz de manifestar actividad antitumoral, incluyen: los tumores humanos conocidos antes mencionados en los que se había confirmado la expresión de hDlk-1 (específicamente, cánceres sólidos tales como tumor neuroendocrino, neuroblastoma, glioma, neurofibromatosis tipo 1, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, cáncer de riñón y cánceres de ovario, y neoplasias sanguíneas tales como el síndrome mielodisplásico y la leucemia mieloide aguda); y cáncer de colon humano, cáncer de mama humano y cáncer de páncreas humano en los que la expresión de hDlk-1 ha sido recientemente confirmada por los autores de la presente invención. De estos, son particularmente preferibles uno o dos o más tipos seleccionados de cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de páncreas humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón microcítico y neuroblastoma humano.

La presencia de la actividad antitumoral *in vivo* se puede confirmar utilizando un ratón que porta cáncer, en el que se han trasplantado subcutáneamente las células tumorales deseadas, y a continuación administrando el anticuerpo obtenido al ratón. En este caso, el anticuerpo se puede administrar al ratón inmediatamente después del trasplante de las células tumorales (un modelo de prevención), o el anticuerpo se puede administrar también al ratón después de que el tumor ha crecido hasta un volumen deseado después del trasplante (un modelo de tratamiento). El método de administración no está limitado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede administrar a la cavidad abdominal del ratón una vez cada 3 días a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal a través de administración intraperitoneal. En el caso del modelo de prevención, la presencia o ausencia de actividad antitumoral y su nivel se pueden evaluar en función de la frecuencia de la formación del tumor y del volumen del tumor. En el caso del modelo de tratamiento, la presencia o ausencia de actividad antitumoral y el nivel de las mismas se pueden evaluar en función del volumen del tumor.

En la presente invención, los ejemplos preferidos de un anticuerpo anti-hDlk-1 que tiene actividad antitumoral *in vivo* incluyen un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (nombre del clon: BA-1-3D) producido por un hibridoma que tiene el N.º de acceso FERM BP-11337, un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (nombre del clon: M3-1) producido por un hibridoma que tiene el N.º de acceso FERM BP-10707, un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (nombre del clon: DI-2-14) producido por un hibridoma que tiene el N.º de acceso FERM BP-10899 y un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (nombre del clon: DI-6) producido por un hibridoma que tiene el N.º de acceso FERM BP-10900. Además, se puede utilizar preferiblemente un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 con el nombre de clon DI-2-14 como anticuerpo que tiene una alta actividad antitumoral *in vivo*.

En la presente memoria, el hibridoma que tiene el N.º de acceso FERM BP-11337 se ha denominado "Hibridoma de Ratón-Ratón: BA-1-3D", y se ha depositado en el Organismo Internacional para el Depósito de Patentes (IPOD), Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología (AIST Tsukuba Central de 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón, Código postal: 305 a 8566), el 1 de febrero de 2011. El hibridoma que tiene el N.º de acceso FERM BP-10707 se ha denominado "Hibridoma de Ratón-Ratón: M3-1", y se ha depositado en el en el mismo instituto nacional indicado anteriormente, el 18 de octubre de 2006. El hibridoma que tiene el N.º de acceso FERM BP-10899 se ha denominado "Hibridoma de Ratón-Ratón DI-2-14" y se ha depositado en el en el mismo instituto nacional indicado anteriormente el 21 de agosto de 2007. El hibridoma que tiene el N.º de acceso FERM BP-10900 se ha denominado "Hibridoma de Ratón-Ratón DI-6", y se ha depositado en el en el mismo instituto nacional indicado anteriormente el 21 de Agosto de 2007.

Otros ejemplos preferidos del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención incluyen un anticuerpo anti-hDlk-1 en el que las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H, son las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 16 a 18, respectivamente, y/o un anticuerpo anti-hDlk-1 en el que las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L, son las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 23 a 25 respectivamente. La región V de la cadena H antes mencionada consiste preferiblemente, por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y particularmente preferiblemente consiste en la SEQ ID NO: 15 (péptido maduro). La región V de la cadena L antes mencionada consiste preferiblemente, por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 20 y particularmente preferiblemente consiste en la SEQ ID NO: 2 (péptido maduro).

Otro ejemplo preferido más del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención es un anticuerpo anti-hDlk-1 que se une a un sitio (p.ej. un epítipo) al cual se une (reconoce) un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma que tiene el N.º de acceso FERM BP-11337, FERM BP-10707, FERM BP-10899 o FERM BP-10900.

(3-6) Epítipo del anticuerpo anti-hDlk-1

Un epítipo (un determinante antigénico) del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención no está limitado siempre que sea al menos una porción de hDlk-1 como antígeno. Por ejemplo, tal epítipo es preferiblemente al menos una porción de una región que consiste en los aminoácidos de las posiciones 24 a 91 (una región que comprende el EGF-1 a EGF-2 de hDlk-1), una región que consiste en los aminoácidos de las posiciones 92 a 167 (una región que comprende el EGF-3 a EGF-4 de hDlk-1), o una región que consiste en los aminoácidos de las posiciones 131 a 244 (una región que comprende el EGF-4 a EGF-6 de hDlk-1), en la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 que se muestra en la SEQ ID NO: 2. Entre otras, es más preferible una región que comprende el EGF-1 a EGF-2 de hDlk-1.

Un anticuerpo anti-hDlk-1 que reconoce (se une a) dichas regiones tiene una alta actividad de internalización en las células tumorales, por ejemplo, y por lo tanto, es extremadamente útil como un inmunocombinado tal como se describe más adelante.

5 (4) Anticuerpo y fragmento de anticuerpo genéticamente recombinante

(4-1) Anticuerpo genéticamente recombinante

10 En una realización preferida del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención, se proporciona un anticuerpo genéticamente recombinante. El tipo de tal anticuerpo genéticamente recombinante no está limitado. Los ejemplos incluyen un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.

15 Un anticuerpo quimérico (es decir, un anticuerpo quimérico humanizado) es un anticuerpo formado por ligación (conjugación) de la región variable de un anticuerpo derivado de ratón con la región constante de un anticuerpo derivado de ser humano (consultar Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855, (1984), etc.). Cuando se produce tal anticuerpo quimérico, el anticuerpo ligado de este modo se puede construir fácilmente mediante una técnica de recombinación genética. Como tales regiones variables del anticuerpo derivado de ratón utilizado en la presente memoria, la región V de la cadena H consiste preferiblemente, por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 13, y particularmente preferiblemente consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 15 (péptido maduro), y la región V de la cadena L consiste preferiblemente, por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 20, y particularmente preferiblemente consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 22 (péptido maduro).

25 Cuando se produce un anticuerpo humanizado, una región determinante de la complementariedad (CDR) se trasplanta de la región variable de un anticuerpo de ratón a la región variable de un anticuerpo humano, con el fin de producir una región variable reconstruida, en la cual una región marco (FR) deriva de la humana y la CDR deriva de la del ratón (lo que se denomina injerto de CDR (trasplante de CDR)). Posteriormente, la región variable humana reconstruida, humanizada de este modo se liga a una región constante humana. En la presente memoria, como tal regiones variables humanas reconstruidas humanizadas, la región V de la cadena H consiste preferiblemente, por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 33, y particularmente preferiblemente consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 35 (péptido maduro), o preferiblemente consiste, por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 38, y particularmente preferiblemente consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 40 (péptido maduro). Por otro lado, la región V de la cadena L consiste preferiblemente, por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 43, y particularmente preferiblemente consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45 (péptido maduro). Como método para producir tales anticuerpos humanizados, cabe citar por ejemplo, Nature, 321, 522-525 (1986); J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987); Queen C et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989); Publicación de patente JP (Kohyo) N.º 4-502408 A (1992) (Patente japonesa N.º 2828340; Queen et al.), etc. El tipo de secuencia de CDR derivada de ratón que puede usarse en la presente memoria para el anticuerpo anti-hDlk-1 humanizado de la presente invención no está limitado. Como ejemplos preferidos de dichas secuencias de CDR derivadas de ratón, las secuencias de aminoácidos como se muestran en las SEQ ID NO: 16 a 18 son preferibles como las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H (en este orden), y las secuencias de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NOS: 23 a 25 son preferibles como las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L (en este orden).

45 Además, la presente invención incluye aminoácidos modificados, en los cuales un aminoácido(s) (preferiblemente uno a varios, y más preferiblemente uno o dos aminoácidos) en una parte de la región V (excluyendo una secuencia CDR) de la cadena H o la cadena L del anticuerpo humanizado mencionado anteriormente está sustituido con otros aminoácidos.

50 Los ejemplos preferidos de dichos aminoácidos modificados incluyen aminoácidos modificados, en los cuales uno o dos aminoácidos en la región V de la cadena H (excluyendo una secuencia CDR) del anticuerpo humanizado mencionado anteriormente están sustituidos con otros aminoácidos. Los ejemplos preferidos de los aminoácidos así sustituidos incluyen aquellos en los cuales la región V de la cadena H es la siguiente:

- 55 (1-1) la región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 67 (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 66), y que consiste particularmente en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69 (péptido maduro) (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 68);
- 60 (1-2) la región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 71 (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 70), y que consiste particularmente en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 73 (péptido maduro) (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 72);
- (1-3) la región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 75 (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 74), y que consiste particularmente en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 77 (péptido maduro) (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 76);
- 65 (2-1) la región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 79 (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 78), y que consiste particularmente en la secuencia de aminoácidos

que se muestra en la SEQ ID NO: 81 (péptido maduro) (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 80); (2-2) la región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 83 (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 82), y que consiste particularmente en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 85 (péptido maduro) (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 84); o
 5 (2-3) la región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 87 (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 86), y que consiste particularmente en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89 (péptido maduro) (la secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 88). De estas, las secuencias de aminoácidos de acuerdo con los apartados (1-3) y
 10 (2-3) anteriores son más preferibles. Por lo tanto, un anticuerpo anti-hDlk-1 humanizado modificado, en el cual la región V de la cadena H se modifica en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1-1) a (2-3) anteriores y la región V de la cadena L consiste en la secuencia de aminoácidos antes mencionada que se muestra en la SEQ ID NO: 43, y particularmente consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45 (péptido maduro), es un anticuerpo humanizado que tiene una avidéz
 15 mucho más alta (actividad de unión al antígeno), y por ejemplo, este anticuerpo es capaz de retener una actividad de unión a las células cancerosas, en cuya superficie el nivel de expresión del antígeno es bajo. Además, el anticuerpo anti-hDlk-1 humanizado modificado es capaz de conservar una actividad estable de unión al antígeno durante un largo período de tiempo en una formulación líquida, en sangre de mono o humana (plasma), etc.

20 En la presente memoria, con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 67 de acuerdo con el apartado (1-1) anterior, la alanina (A) en la posición 43 está sustituida con glicina (G) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 33; y con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69 de acuerdo con el apartado (1-1) anterior, la alanina (A) en la posición 24 está sustituida con glicina (G) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 35 (péptido maduro).

25 Además, con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 71 de acuerdo con el apartado (1-2) anterior, la treonina (T) en la posición 93 está sustituida con lisina (K) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 33; y con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 73 de acuerdo con el apartado (1-2) anterior, la treonina (T) en la posición 74 está sustituida con lisina (K) en la
 30 secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 35 (péptido maduro).

35 Además, con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 75 de acuerdo con el apartado (1-3) anterior, la alanina (A) en la posición 43 está sustituida con glicina (G) y la treonina (T) en la posición 93 está sustituida con lisina (K) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 33; y con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 77 de acuerdo con el apartado (1-3) anterior, la alanina (A) en la posición 24 está sustituida con glicina (G) y la treonina (T) en la posición 74 es sustituida con lisina (K) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 35 (péptido maduro).

40 Además, con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 79 de acuerdo con el apartado (2-1) anterior, la alanina (A) en la posición 43 está sustituida con glicina (G) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ. ID NO: 38; y con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 81 de acuerdo con el apartado (2-1) anterior, la alanina (A) en la posición 24 está sustituida con glicina (G) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 40 (péptido maduro).

45 Además, con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 83 de acuerdo con el apartado (2-2) anterior, la treonina (T) en la posición 93 está sustituida con lisina (K) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ. ID NO: 38; y con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 85 de acuerdo con el apartado (2-2) anterior, la treonina (T) en la posición 74 está sustituida con lisina (K) en la
 50 secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 40 (péptido maduro).

55 Además, con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 87 de acuerdo con el apartado (2-3) anterior, la alanina (A) en la posición 43 está sustituida con glicina (G) y la treonina (T) en la posición 93 está sustituida con lisina (K) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 38; y con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89 de acuerdo con el apartado (2-3) anterior, la alanina (A) en la posición 24 está sustituida con glicina (G) y la treonina (T) en la posición 74 está
 60 sustituida con lisina (K) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 40 (péptido maduro).

65 En general, en el caso de un anticuerpo humano (un anticuerpo humano completo), su estructura que comprende una región hipervariable que es el sitio de unión al antígeno de una región V, otras partes de la región V y una región constante es la misma que la estructura del anticuerpo de un ser humano. Sin embargo, tal sitio hipervariable también puede derivar de otros animales. Se conoce públicamente una técnica de producción de un anticuerpo humano y se ha establecido un método para la producción de secuencias génicas que son comunes en seres humanos mediante ingeniería genética. Un anticuerpo humano se puede conseguir, por ejemplo, por medio de un método que utiliza un ratón productor de un anticuerpo humano que tiene fragmentos cromosómicos humanos que comprenden los genes de la cadena H y la cadena L del anticuerpo humano (consultar Tomizuka, K. et al., Nature Genetics, (1977) 16, 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nuc. Acids Res., (1998) 26, 3447-3448; Yoshida, H. et al, Animal

Cell Technology: Basic and Applied Aspects, (1999) 10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. y Iijima, S. eds), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000) 97, 722-727, etc.), o mediante un método de obtención de un anticuerpo humano derivado de presentación en fagos seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos (consultar Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science., (2002) 43 (7), 2301-8; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics, (2002) 1 (2), 189-203; Siriwardena, D. et. al., Ophthalmology, (2002) 109 (3), 427-431, etc.).

En el caso del anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado y el anticuerpo humano anteriormente mencionados, la cadena de azúcar unida mediante N-glicósido en la región Fc de anticuerpo es preferiblemente, por ejemplo, una cadena de azúcar, en la que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la misma. Un ejemplo específico es un anticuerpo que consiste en moléculas de anticuerpos genéticamente recombinantes, que tienen, en la región Fc de las moléculas de anticuerpo, una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa no se une a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar conectada mediante N-glicósido a través de un enlace α . Dicho anticuerpo es capaz de mejorar significativamente la actividad ADCC. Este punto (las características de la cadena de azúcar unida mediante N-glicósido en la región Fc de anticuerpo) es preferible también para el anticuerpo policlonal y el anticuerpo monoclonal mencionados anteriormente.

(4-2) Fragmento de anticuerpo

El fragmento de anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención está incluido en el anticuerpo de la presente invención. En la presente memoria, el fragmento de anticuerpo de la presente invención tiene actividad de unión a hDlk-1 y actividad antitumoral *in vivo*, como en el caso del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención (que incluye anticuerpos humanizados y similares, distintos de los anticuerpos de ratón).

El fragmento de anticuerpo significa una región de una porción de un anticuerpo policlonal anti-hDlk-1 o anticuerpo monoclonal anti-Dlk-1 (concretamente, un fragmento de anticuerpo derivado del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención). Los ejemplos de un fragmento de tal anticuerpo incluyen péptidos que comprenden, como al menos una porción del mismo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (fragmento variable de anticuerpo), un anticuerpo de cadena sencilla (una cadena H, una cadena L, una región V de la cadena H y una región V de la cadena L, etc.), scFv, diacuerpo (dímero de scFv), dsFv (una región V estabilizada por disulfuro) y una región determinante de la complementariedad (CDR).

El Fab es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50.000 que tiene actividad de unión al antígeno, que se forma uniendo aproximadamente una mitad de la porción N-terminal de la cadena H y toda la cadena L a través de un enlace disulfuro, entre los fragmentos obtenidos mediante el tratamiento de moléculas de anticuerpo con una proteasa, la papaína. Además, también es posible producir tales Fab insertando ADN que codifica el Fab de un anticuerpo en un vector de expresión procariótico o un vector de expresión eucariótico e introduciendo a continuación el vector en un procarionte o un eucariote con el fin de permitir que el ADN se exprese en los mismos.

El F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 100.000 que tiene actividad de unión al antígeno, cuyo tamaño es ligeramente mayor que el Fab que se une a Fab a través de un enlace disulfuro en la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de moléculas de anticuerpo con una proteasa, la pepsina. Además, también es posible producir tales F(ab')₂ mediante enlace tioéter o disulfuro de Fab, como se describe más adelante.

El Fab' es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50.000 que tiene actividad de unión al antígeno, que se forma escindiendo el enlace disulfuro en la región bisagra de F(ab')₂ mencionado anteriormente. Además, también es posible producir tal Fab' insertando el ADN que codifica el fragmento Fab' de un anticuerpo en un vector de expresión procariótico o un vector de expresión eucariótico y a continuación introduciendo el vector en un procarionte o un eucariote con el fin de permitir que el ADN se exprese en los mismos.

El scFv es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión al antígeno, que es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH formado por la unión de una sola región V de la cadena H (VH) a una sola región V de la cadena L (VL) utilizando un conector peptídico adecuado (P). Tal scFv puede producirse obteniendo ADNc que codifica la VH y la VL de un anticuerpo, construyendo el ADN que codifica el scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariontes o un vector de expresión para eucariotes y a continuación introduciendo el vector en un procarionte o un eucariote con el fin de permitir que el ADN se exprese en los mismos.

El diacuerpo es un fragmento de anticuerpo formado por la dimerización de scFv, que tiene actividades de unión al antígeno divalentes. Tales actividades de unión al antígeno divalentes pueden ser idénticas entre sí, o también pueden ser diferentes entre sí. Tal diacuerpo puede producirse obteniendo ADNc que codifica la VH y la VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica scFv de tal manera que la longitud de la secuencia de aminoácidos de P sea de 8 restos o menos, insertando el ADN en un vector de expresión para procariontes o un vector de expresión para eucariotes y a continuación introduciendo el vector en un procarionte o un eucariote con el fin de permitir que el ADN se exprese en los mismos.

El dsFv es un fragmento de anticuerpo formado mediante la unión de polipéptidos, en el que un resto de aminoácido en cada una de VH y VL ha sido sustituido por un resto de cisteína entre sí a través de un enlace disulfuro entre los restos de cisteína. El resto de aminoácido que se va a sustituir por restos de cisteína se puede seleccionar basándose en la estimación de la estructura tridimensional del anticuerpo de acuerdo con el método de Reiter et al. (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994). Tal dsFv puede producirse obteniendo ADNc que codifica VH y VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariontes o un vector de expresión para eucariotes y a continuación introduciendo el vector en un procarionte o un eucariote con el fin de permitir que el ADN se exprese en los mismos.

Un péptido que comprende las CDR comprende al menos una región de las CDR (CDR 1 a 3) de VH o VL. Múltiples péptidos que comprenden las CDR se pueden unir entre sí, directamente o a través de un conector peptídico adecuado. Tal péptido que comprende las CDR se puede producir construyendo ADN que codifica la VH y VL de un anticuerpo, insertando el ADN en un vector de expresión para procariontes o un vector de expresión para eucariotes y a continuación introduciendo el vector de expresión en un procarionte o un eucariote, así como permitiendo que el ADN se exprese en los mismos. Por otra parte, tal péptido que comprende las CDR también se puede producir mediante métodos de síntesis química tales como un método Fmoc (un método con fluorenilmetiloxycarbonilo) y un método tBoc (un método con t-butiloxycarbonilo).

El fragmento de anticuerpo de la presente invención, tal cual, puede ser un fragmento de anticuerpo, que comprende una parte o toda la región Fc del anticuerpo en el que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida mediante N-glicósido. Por otro lado, el fragmento de anticuerpo de la presente invención también puede ser una proteína de fusión, en la que el fragmento de anticuerpo antes mencionado se fusiona con una parte o toda la región Fc del anticuerpo en el que fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de una cadena de azúcar conectada mediante N-glicósido. Tal fragmento de anticuerpo es capaz de mejorar significativamente la actividad de ADCC y por lo tanto es preferible.

El tipo del fragmento de anticuerpo de la presente invención no está limitado. Los ejemplos específicos del presente fragmento de anticuerpo incluyen fragmentos de anticuerpos que comprenden, como al menos una porción de los mismos, las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 16 a 18 (CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H). Específicamente, ejemplos de tales fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos de anticuerpos que comprenden cada uno la secuencia de aminoácidos (la región V de la cadena H) que se muestra en una cualquiera de SEQ ID NO: 13 (en particular, SEQ ID NO: 15), SEQ ID NO: 33 (en particular, SEQ ID NO: 35), SEQ ID NO: 38 (en particular, SEQ ID NO: 40), SEQ ID NO: 67 (en particular, SEQ ID NO: 69), SEQ ID NO: 71 (en particular, SEQ ID NO: 73), SEQ ID NO: 75 (en particular, SEQ ID NO: 77), SEQ ID NO: 79 (en particular, SEQ ID NO: 81), SEQ ID NO: 83 (en particular, SEQ ID NO: 85) y SEQ ID NO: 87 (en particular, SEQ ID NO: 89). Además, otros ejemplos específicos de los presentes fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de anticuerpos que comprenden, como al menos una porción de los mismos, la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 23 a 25 (CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L). Un ejemplo específico es un fragmento de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos (la región V de la cadena L) que se muestra en la SEQ ID NO: 20 (en particular, SEQ ID NO: 22) o SEQ ID NO: 43 (en particular, SEQ ID NO: 45).

En lo sucesivo, en las descripciones de la presente memoria descriptiva, los fragmentos de anticuerpos anteriormente mencionados están también incluidos en el anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención.

3. Preparación del complejo de anticuerpo-agente

Como producto inmunoconjugado preparado utilizando el anticuerpo anti-hDlk-1 anteriormente mencionado de la presente invención, se puede proporcionar un complejo de anticuerpo-agente, que comprende el anticuerpo anteriormente mencionado y un compuesto que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células. Hay que señalar que un complejo formado preparando previamente cada una de la molécula de anticuerpo mencionada anteriormente y el compuesto mencionado anteriormente que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células, por separado y combinándolos a continuación se denomina generalmente producto inmunoconjugado. Por otro lado, un complejo obtenido ligando una toxina proteica utilizada como tal compuesto que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células a un gen de anticuerpo en un gen de acuerdo con una técnica de recombinación genética, de manera que le permita expresarse como una sola proteína (una proteína de fusión), se denomina generalmente inmunotoxina.

Los ejemplos de un compuesto que tiene actividad antitumoral incluyen doxorrubicina, caliqueamicina, mitomicina C y auristatina E.

Los ejemplos de un compuesto que tiene la actividad destructora de células incluyen saporina, lisina, exotoxina de Pseudomonas y toxina de la difteria. De éstos, se utilizan preferiblemente saporina y exotoxina de pseudomonas.

Un método para producir un complejo de anticuerpo-agente no está limitado. Por ejemplo, se aplica un método de acoplamiento de un anticuerpo con un agente a través de un enlace disulfuro o un enlace hidrazona.

El anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención anteriormente mencionado es excelente en términos de actividad de internalización en células tumorales diana que expresan hDlk-1. Por lo tanto, combinando previamente un compuesto que tiene actividad antitumoral y actividad destructora de células con el anticuerpo anti-hDlk-1, tal compuesto puede actuar directamente y muy selectivamente sobre las células tumorales. El complejo de anticuerpo-agente de la presente invención es extremadamente excelente en términos de capacidad de liberación del agente a las células tumorales diana.

La actividad de internalización en las células se puede evaluar marcando fluorescentemente un anticuerpo con rodamina o similar y a continuación observar el comportamiento migratorio y la localización del anticuerpo utilizando un microscopio de fluorescencia o similar.

Por otra parte, en la presente invención, además del complejo de anticuerpo-agente antes mencionado, también se puede proporcionar un complejo de fragmento de anticuerpo-agente, en el cual el fragmento de anticuerpo antes mencionado se utiliza en lugar de un anticuerpo. Con respecto a los detalles de tal complejo de fragmento de anticuerpo-agente, se pueden aplicar, según sea apropiado, las descripciones del complejo anticuerpo-agente anteriormente mencionado.

En lo sucesivo, en las descripciones de la presente memoria descriptiva, tal complejo de fragmento de anticuerpo-agente está también incluido en el complejo de anticuerpo-agente de la presente invención.

4. Composición farmacéutica

El anticuerpo anti-hDlk-1 y el complejo de anticuerpo-agente de la presente invención son útiles como principios activos contenidos en una composición farmacéutica.

La composición farmacéutica es útil como una composición farmacéutica para tratar y/o diagnosticar un tumor. Es decir, el anticuerpo anti-hDlk-1 y el complejo anticuerpo-agente de la presente invención son útiles como principios activos contenidos en un agente terapéutico tumoral o un agente de diagnóstico tumoral. En la presente memoria, el tratamiento de un tumor incluye la inhibición de la angiogénesis tumoral (en lo sucesivo, lo mismo se aplica a lo largo de la presente memoria).

El anticuerpo anti-hDlk-1 y el complejo anticuerpo-agente de la presente invención son preferibles porque no provocan efectos secundarios tales como la reducción de peso cuando se usan en el tratamiento de un tumor.

Además, la presente composición farmacéutica es útil como una composición farmacéutica utilizada en la inducción de apoptosis en células tumorales. Es decir, el anticuerpo anti-hDlk-1 y el complejo anticuerpo-agente de la presente invención son útiles como principios activos contenidos en un agente para inducir apoptosis en células tumorales.

Es preferible proporcionar la composición farmacéutica de la presente invención en forma de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-hDlk-1 y/o el complejo de anticuerpo-agente de la presente invención como principio o principios activos y que comprende adicionalmente un vehículo farmacológicamente aceptable.

Las enfermedades diana (tumores), a los que se aplica la composición farmacéutica de la presente invención, incluyen: los tumores humanos conocidos anteriormente mencionados, en los cuales ya se ha confirmado la expresión de hDlk (específicamente cánceres sólidos tales como tumor neuroendocrino, neuroblastoma, glioma, neurofibromatosis tipo 1, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, cáncer de riñón y de ovario, y neoplasias sanguíneas, tales como el síndrome mielodisplásico y la leucemia mielocítica aguda); y cáncer de colon humano, cáncer de mama humano y cáncer de páncreas humano, en los cuales la expresión de hDlk-1 fue confirmada por primera vez por los inventores de la presente invención. Entre otros, son particularmente preferibles uno o dos o más tipos seleccionados de cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de páncreas humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neurocitoma humano. Dicha enfermedad diana puede ser una única enfermedad, o pueden desarrollarse dos o más enfermedades en combinación.

Los ejemplos del "vehículo farmacológicamente aceptable" incluyen un excipiente, un diluyente, un expansor, un disgregante, un estabilizador, un conservante, un tampón, un emulsionante, un agente aromático, un agente colorante, un edulcorante, un espesante, un corrector, un solubilizante y otros aditivos. Utilizando uno o más tipos de tales vehículos, se puede preparar una composición farmacéutica en forma de un inyectable, un agente líquido, una cápsula, una suspensión, una emulsión, un jarabe, etc. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral o parenteral. Otra forma para la administración parenteral es un inyectable que comprende uno o más principios activos, que se prepara por medio de un método habitual. Tal inyectable se puede producir disolviendo o suspendiendo el presente anticuerpo en un vehículo farmacológicamente aceptable, tal como una solución salina normal o agua destilada comercializada utilizada para el inyectable.

En particular, cuando un fragmento de anticuerpo derivado del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención (particularmente, un fragmento de anticuerpo con un bajo peso molecular) se administra a un organismo vivo, se puede utilizar un sistema de dispersión coloidal además de los componentes anteriormente mencionados. Se prevé

que tal sistema de dispersión coloidal tenga un efecto de mejora de la estabilidad de un compuesto (un fragmento de anticuerpo) en un organismo vivo o un efecto de transporte eficaz de tal compuesto a un órgano, tejido, o célula específicos. El tipo de tal sistema de dispersión coloidal no está limitado, con tal de que se utilice comúnmente. Un ejemplo de tal sistema de dispersión coloidal es un sistema de dispersión que comprende, como base, polietilenglicol, un complejo macromolecular, un añadido macromolecular, una nanocápsula, microesferas, perlas y lípidos incluyendo un emulsionante de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Los ejemplos preferidos de un sistema de dispersión coloidal incluyen múltiples liposomas y las vesículas de membrana artificial, que tienen un efecto de transporte eficaz de tal compuesto a un órgano, tejido, o célula específicos (Mannino et al., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698).

La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención difiere dependiendo de la edad, el sexo, el peso corporal y los síntomas del paciente, los efectos terapéuticos, el método de administración, el tiempo de tratamiento, los tipos de anticuerpo anti-hDlk-1 y el complejo de anticuerpo-agente de la presente invención contenido en la composición farmacéutica, etc. En general, la presente composición farmacéutica se puede administrar en el intervalo entre 600 µg y 6.000 mg por adulto por administración. Sin embargo, la dosis no está limitada al intervalo anteriormente mencionado.

En un caso en el que la composición farmacéutica se administra en forma de un inyectable, por ejemplo, se puede administrar a una dosis de 10 µg a 100 mg, o de 30 µg a 100 mg, o de 50 µg a 100 mg, o de 100 µg a 100 mg, por administración y por peso corporal de un paciente humano, o puede administrarse a una dosis en un intervalo en el cual los límites inferiores de las dosis mencionadas anteriormente se combinan según corresponda (p. ej. de 30 µg a 200 µg o de 100 µg a 500 µg), una vez o dividida en varias administraciones, como una dosis diaria media. Los ejemplos de la forma de dosificación incluyen inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección intramuscular e inyección intraperitoneal. De éstas, es preferible la inyección intravenosa. Además, tal inyectable se puede preparar en forma de un diluyente no acuoso (p. ej., polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, alcoholes tales como etanol, etc.), una suspensión, o una emulsión. Tal inyectable se puede esterilizar mediante esterilización mecánica utilizando un filtro, la mezcla de un microbicida, etc. El inyectable se puede producir en forma de un inyectable que se prepara antes de su uso. Es decir, una composición sólida esterilizada se prepara mediante un método de liofilización o similares, y la composición se disuelve a continuación en agua destilada esterilizada utilizada para inyectables u otros disolventes antes de su uso, de modo que se puede utilizar a continuación.

La presente invención proporciona el uso del anticuerpo anti-hDlk-1 y/o complejo de anticuerpo-agente anteriormente mencionados de la presente invención en la producción de un fármaco (un agente) para el tratamiento de un tumor, el diagnóstico de un tumor y/o la inducción de apoptosis en las células tumorales. Además, la presente invención proporciona el anticuerpo anti-hDlk-1 y/o el complejo de anticuerpo-agente anteriormente mencionados de la presente invención, los cuales se usan para el tratamiento de un tumor, el diagnóstico de un tumor y/o la inducción de apoptosis en células tumorales.

Además, la presente invención proporciona un método para tratar un tumor, un método para diagnosticar un tumor y/o un método para inducir apoptosis en células tumorales, que comprende usar (es decir, administrar a pacientes) el anticuerpo anti-hDlk-1 y/o el complejo anticuerpo-agente anteriormente mencionados de la presente invención. Además, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo anti-hDlk-1 y/o el complejo de anticuerpo-agente anteriormente mencionados de la presente invención para el tratamiento de un tumor, el diagnóstico de un tumor y/o la inducción de apoptosis en células tumorales.

5. Método para la detección de tumores

El método para la detección de un tumor de la presente invención (que puede ser un método para diagnosticar un tumor) se caracteriza por que comprende permitir que el mencionado anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención reaccione con una muestra obtenida de un organismo vivo (denominada en lo sucesivo muestra biológica) y detectar una señal del anticuerpo que ha reaccionado.

Como se describió anteriormente, puesto que se ha confirmado que hDlk-1 se expresa específicamente en diversos tipos de células tumorales, se puede utilizar hDlk-1 y en particular, hDlk-1 libre (una porción de la región extracelular de hDlk-1) como marcador para diversos tipos de tumores. En particular, tal hDlk-1 se puede utilizar preferiblemente como marcador para el cáncer de colon humano, el cáncer de mama humano y el cáncer de hígado humano.

Por lo tanto, se permite que el anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención reaccione con una muestra biológica y a continuación se detecta una señal del anticuerpo que ha reaccionado, con el fin de detectar un tumor. La señal de anticuerpo obtenida se puede utilizar como un indicador de la cantidad de un antígeno en la muestra biológica (es decir, la cantidad de hDlk-1 o la cantidad de hDlk-1 libre). En la detección del tumor utilizando el anticuerpo de la presente invención, primero, se permite que una muestra biológica recogida como analito de un sujeto, tal como un corte de un tejido o sangre que se utiliza como diana de ensayo, se una al anticuerpo de la presente invención por medio de una reacción antígeno-anticuerpo. Con posterioridad, basándose en los resultados de la medición de la

cantidad de anticuerpo unido, se mide la cantidad de un antígeno de interés contenido en la muestra biológica. Esta medición puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos de inmunoensayo conocidos. Por ejemplo, se pueden utilizar un método de inmunoprecipitación, un método de inmunoaglutinación, radioinmunoensayo, inmunonefelometría, un método de transferencia Western, citometría de flujo y similares. En el radioinmunoensayo, se utiliza un anticuerpo marcado y por lo tanto una señal de anticuerpo se expresa como la cantidad de anticuerpo marcado que se detecta directamente. Por otra parte, se puede utilizar un anticuerpo cuya concentración o título de anticuerpos sea conocida como una solución patrón y de este modo una señal del anticuerpo diana se puede expresar como un valor relativo. Es decir, tanto la solución patrón como el analito se pueden medir utilizando un dispositivo de medición y una señal de anticuerpo en una muestra biológica se puede expresar como un valor relativo al valor de la solución patrón que se utiliza como criterio. Los ejemplos de tales radioinmunoensayos incluyen el método ELISA, el método EI, el método RIA, el inmunoensayo de fluorescencia (FIA) y el inmunoensayo de luminiscencia. De éstos, el método ELISA es particularmente preferible puesto que es simple y muy sensible.

En la presente invención, el estado de tumor se puede evaluar o diagnosticar, utilizando el resultado de detección obtenido por medio del método de detección antes mencionado como indicador. Por ejemplo, cuando el resultado de la detección excede de un valor estándar predeterminado, el estado de tumor se define como tumor positivo y cuando el resultado de la detección es menor que el valor estándar predeterminado, éste se define como tumor negativo. En el caso del tumor positivo, se determina que se podría haber desarrollado un cierto tipo de tumor y por lo tanto se puede evaluar el estado del tumor. La expresión "estado del tumor" se utiliza en la presente memoria para significar la presencia o ausencia del desarrollo de tumor, o el grado de progresión del mismo. Por lo tanto, los ejemplos específicos del estado del tumor incluyen la presencia o ausencia de desarrollo del tumor, el grado de progresión del mismo, el grado de malignidad, la presencia o ausencia de metástasis y la presencia o ausencia de recurrencia.

En la evaluación anteriormente mencionada, en cuanto al estado del tumor que se va a evaluar, solo se puede seleccionar un estado a partir de los ejemplos mencionados anteriormente, o se pueden combinar y seleccionar múltiples ejemplos. La presencia o ausencia del tumor se pueden evaluar mediante la determinación de si el tumor se ha desarrollado o no, con referencia al valor estándar predeterminado utilizado como límite, basándose en el resultado de detección obtenido. El grado de malignidad se utiliza como un indicador que indica el grado de progreso del cáncer. Basándose en el resultado de la detección, el tumor diana se puede clasificar en un cierto estadio de la enfermedad y se puede evaluar. Por otra parte, el cáncer temprano y el cáncer avanzado se pueden distinguir entre sí y en ese caso se pueden evaluar. Por ejemplo, también es posible determinar el tumor diana como cáncer temprano o cáncer avanzado, utilizando el resultado de la detección como indicador. La metástasis tumoral se puede evaluar determinando si ha aparecido neoplasia o no en un sitio aparte de la posición de la lesión inicial, utilizando el resultado de la detección como indicador. La recurrencia se puede evaluar mediante la determinación de si el resultado de la detección ha superado o no el valor estándar predeterminado de nuevo después de la etapa de intervalo o de remisión.

6. Kit para la detección o el diagnóstico de tumores y kit para el tratamiento de tumores o inducción de apoptosis en las células tumorales

El anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención se puede proporcionar en forma de un kit para detectar un tumor o un kit para o diagnosticar un tumor. Además, el anticuerpo anti-hDlk-1 y el complejo anticuerpo-fármaco de la presente invención se puede proporcionar en la forma de un kit para el tratamiento de un tumor o un kit para la inducción de apoptosis en células tumorales.

El kit de la presente invención comprende una sustancia marcadora, un reactivo en fase sólida sobre el cual se ha inmovilizado el anticuerpo o el anticuerpo marcado, etc., así como el anticuerpo antes mencionado. Una sustancia marcadora que marca el anticuerpo significa una sustancia marcada con una enzima, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, etc. El kit de la presente invención también puede comprender otros reactivos utilizados para llevar a cabo la detección de la presente invención, además de los elementos integrantes mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando tal sustancia marcadora es una sustancia de marcado enzimático, el kit de la presente invención puede comprender un sustrato enzimático (un sustrato cromogénico, etc.), una solución disolvente del sustrato enzimático, una solución de parada de la reacción enzimática, un diluyente utilizado para análisis, etc. Además, el presente kit puede comprender adicionalmente diversos tipos de tampones, agua esterilizada, diversos tipos de recipientes de cultivo de células, diversos tipos de reactores (un tubo Eppendorf, etc.), un agente de bloqueo (un componente del suero tal como albúmina de suero bovino (BSA), leche desnatada, o suero de cabra), un agente de lavado, un agente tensoactivo, varios tipos de placas, un antiséptico tal como azida de sodio, un manual de funcionamiento experimental (instrucciones), etc.

El kit de la presente invención se puede utilizar eficazmente para llevar a cabo el método de detección de un tumor, el método de tratamiento de un tumor y el método para la inducción de apoptosis en células tumorales de la presente invención anteriormente descrito, etc. Por lo tanto, el presente kit es extremadamente útil.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá más específicamente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1Clonación del gen del anticuerpo monoclonal anti-Dlk-1 humana de ratón (clon BA-1-3D) y determinación de las secuencias de la región variable

5 Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-Dlk-1 humana de ratón, clon BA-1-3D (IgG2a de ratón) que exhibía una actividad inhibidora del crecimiento tumoral significativa en el documento WO 2008/056833 (como se describe anteriormente, Documento de Patente 4) y en el documento WO 2009/116670 (como se describió anteriormente, Documento de Patente 5) (en lo sucesivo denominado "ratón BA-1-3D"). Un hibridoma que genera el BA-1-3D de ratón se le denomina "Hibridoma de ratón-ratón BA-1-3D" y ha sido depositado en el Depositario del Organismo Internacional de Patentes (IPOD), Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba AIST Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón, código postal: 305-8566) el 1 de febrero de 2011 (número de acceso: FERM BP-11337).

15 El hibridoma generador de BA-1-3D de ratón mencionado anteriormente se cultivó a 37 °C en un medio RPMI-1640 que contenía un 20 % de suero bovino fetal (FBS; HyClone), piruvato sódico 1 mM, penicilina 100 unidades/ml, 100 µg/ml de estreptomycin y 1 x Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) en un incubador con 7,5 % de CO₂. El ARN total fue extraído de 10⁷ hibridomas usando un reactivo TRIzol (Invitrogen), y después, usando cebadores oligo dT, se sintetizó el ADNc a partir del ARN total empleando el kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE (Clontech, Mountain View, CA) de acuerdo con el método incluido en el kit. Utilizando el ADNc así sintetizado como molde, se clonaron los genes que codifican la región variable de la cadena H (VH) y la región variable de la cadena L (VL) del BA-1-3D de ratón mediante un método de PCR que emplea ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs, Beverly, MA). En el método de PCR, se utilizó como cebador 5' Universal Primer A Mix (UPM) o Nested Universal Primer A (NUP) incluido con el kit. Por otro lado, como cebador 3' para la amplificación de VH, se utilizó un cebador que tiene una secuencia complementaria a la región constante de γ2a de ratón, y como cebador 3' para la amplificación de VL, se utilizó un cebador que tiene una secuencia complementaria a la de la región constante κ de ratón.

Cebador 5' (Cebador F; Universal Primer A Mix (UPM)):

Largo:

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (SEQ ID NO: 3)

Corto:

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEQ ID NO: 4)

Cebador 5' (Cebador F; Nested Universal Primer A (NUP)):

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (SEQ ID NO: 5)

Cebador 3' (cebador R):

VH: 5'-GCCAGTGGATAGACCGATGG-3' (SEQ ID NO: 6)

VL: 5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3' (SEQ ID NO: 7)

La reacción de PCR se llevó a cabo con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción usando cada uno de los cebadores mencionados anteriormente.

<Composición de la solución de reacción>

ADNc molde	2,5 µl
5x Tampón PrimeSTAR (Mg ²⁺ plus):	10 µl
dNTP 2,5 mM:	4 µl
Phusion ADN polimerasa (2,0 U/µl):	0,5 µl
10x UPM o NUP:	5 µl
Cebador R (10 µM):	1 µl
Agua esterilizada	27 µl
Total	50 µl

<Condiciones de reacción>

Después de completar la reacción a 94 °C (10 seg), un ciclo que consiste en "desnaturalización/disociación térmica: 98 °C (10 seg) → Hibridación: 60 °C (5 seg) → Síntesis/elongación: 72 °C (60 segundos)" se repitió 30 veces (un total de 30 ciclos). Finalmente, la reacción se llevó a cabo a 72 °C (3 min).

Los ADNc sintetizados de VH y VL (BA-1-3D VH y BA-1-3D VL) del BA-1-3D de ratón se subclonaron en un vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen), y se determinaron las secuencias de nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos de una pluralidad de clones de VH y clones de VL se decodificaron, y se identificaron las secuencias de nucleótidos típicas de las regiones variables de la cadena H y la cadena L de ratón. La Figura 1 y la Figura 2 muestran las secuencias de nucleótidos de ADNc consenso de BA-1-3D VH y BA-1-3D VL y sus secuencias de aminoácidos putativas.

Ejemplo 2

10 Construcción del vector de expresión quimérico ratón/humano BA-1-3D IgG1/k

Se generó un gen que codifica BA-1-3D VH (gen BA-1-3D VH) como un exón, al que se añadió una señal de un donante de corte y empalme derivada de la secuencia de células JH4 de la línea germinal de ratón y a cuyos ambos extremos se añadieron sitios de enzimas de restricción. Específicamente, el gen se sintetizó de acuerdo con un método de PCR usando el ADNc del gen VH BA-1-3D como molde. Durante la reacción de PCR, se utilizó un cebador 5', al que se había añadido un sitio SpeI como sitio de enzima de restricción para ser insertado en un vector de expresión de célula animal, y un cebador 3', al que se había añadido un sitio HindIII como sitio de enzima de restricción.

20 Cebador 5' (cebador F):

5'-GCAACTAGTACCACCATGGGTTGGAGCTGTATC-3' (SEQ ID NO: 8) (Subrayado: sitio SpeI)

Cebador 3' (cebador R):

25 5'-GGGAAGCTTGAGAGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGT-3' (SEQ ID NO: 9) (Subrayado: sitio HindIII)

30 La reacción de PCR se llevó a cabo con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción, usando cada uno de los cebadores mencionados anteriormente (SEQ ID NOS: 8 y 9).

<Composición de la solución de reacción>

ADNc molde	1,0 µl
5x Tampón PrimeSTAR (Mg ²⁺ plus):	10 µl
dNTP 2,5 mM:	4 µl
Phusion ADN polimerasa (2,0 U/µl):	0,5 µl
Cebador F (10 µM):	3 µl
Cebador R (10 µM):	1,0 µl
Agua esterilizada	30,5 µl
<hr/> Total	<hr/> 50 µl

35 <Condiciones de reacción>

Un ciclo que consiste en "Desnaturalización/disociación térmica: 98 °C (10 segundos) → Hibridación: 57 °C (10 segundos) → Síntesis/elongación: 72 °C (60 segundos)" se repitió 35 veces (un total de 35 ciclos).

40 Asimismo, se generó un gen que codifica BA-1-3D VL (gen BA-1-3D VL) como un exón, al que se añadió una señal de un donante de corte y empalme derivada de la secuencia de células germinales de ratón Jk5 y a cuyos extremos se añadieron sitios de la enzima de restricción. Específicamente, el gen se sintetizó de acuerdo con un método de PCR usando el ADNc del gen BA-1-3D VL como molde. Durante la reacción de PCR, se añadió un cebador 5', al que se había añadido un sitio NheI como un sitio de enzima de restricción para insertarlo en un vector de expresión de célula animal, y un cebador 3', al que se había añadido un sitio EcoRI como sitio de enzima de restricción.

Cebador 5' (cebador F):

50 5'-GCTGCTAGCACCAACCATGGAATCACAGACCCAG-3' (SEQ ID NO: 10) (Subrayado: sitio NheI)

Cebador 3' (cebador R):

55 5'-GCAGAATTCAGAAAAGTGTACTTACGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCC-3' (SEQ ID NO: 11) (Subrayado: sitio EcoRI)

La reacción de PCR se llevó a cabo con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción, usando cada uno de los cebadores mencionados anteriormente (SEQ ID NOS: 10 y 11).

<Composición de la solución de reacción>

ADNc molde	1,0 µl
5x Tampón PrimeSTAR (Mg ²⁺ plus):	10 µl
dNTP 2,5 mM:	4 µl
Phusion ADN polimerasa (2,0 U/µl):	0,5 µl
Cebador F (10 µM):	3 µl
Cebador R (10 µM):	1,0 µl
Agua esterilizada	30,5 µl
Total	50 µl

<Condiciones de reacción>

5 Un ciclo que consiste en “Desnaturalización/disociación térmica: 98 °C (10 segundos) → Hibridación: 57 °C (10 segundos) → Síntesis/elongación: 72 °C (60 segundos)” se repitió 35 veces (un total de 35 ciclos).

10 Los genes BA-1-3D VH y BA-1-3D VL así generados que tienen funciones como exones se muestran en la Figura 3 y en la Figura 4, respectivamente.

15 Los genes BA-1-3D VH y BA-1-3D VL generados se subclonaron cada uno en un vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen), y luego se determinaron las secuencias de nucleótidos de los mismos. Posteriormente, utilizando un sitio SpeI/HindIII para la inserción del gen BA-1-3D VH y también utilizando un sitio NheI/EcoRI para la inserción del gen BA-1-3D VL, estos genes se insertaron cada uno en un vector de expresión de célula animal. (Figura 5) que tiene las regiones constantes de la cadena γ1 y la cadena κ humanas, para generar así un vector de expresión quimérico ratón-humano BA-1-3D IgG1/κ (ChBA-1-3D) (pChBA-1-3D).

Ejemplo 3**Generación de genes BA-1-3D VH y VL humanizados**

25 El diseño de humanización de BA-1-3D VH y BA-1-3D VL se llevó a cabo de la siguiente manera según el método de Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, 1989). Primero, se llevó a cabo mediante ordenador el modelado molecular de las estructuras tridimensionales de las regiones variables del anticuerpo BA-1-3D, y luego se identificaron los aminoácidos en una región marco relevante para la formación de estructuras CDR. Al mismo tiempo, se realizó una búsqueda de homología entre las regiones variables de BA-1-3D y las secuencias de la región variable de los genes del anticuerpo humano, para seleccionar el ADNc (U00503 VH) con el número de acceso GenBank: U00503 (Huang y Stollar, J. Immunol. 151: 5290, 1993) como un aceptor para proporcionar una región marco (FR) necesaria para la humanización de BA-1-3D VH. Del mismo modo, se seleccionó el ADNc (Z46622 VL) con el número de acceso de GenBank: Z46622 (Giachino et al., J. Exp. Medicina. 181: 1245, 1995) como un aceptor para proporcionar una región marco (FR) necesaria para la humanización de BA-1-3D VL.

35 Para la humanización de BA-1-3D VH, la secuencia de CDR de BA-1-3D VH se trasplantó primero en la posición correspondiente en U00503 VH como un aceptor. Posteriormente, como resultado del análisis de estructuras tridimensionales mediante modelado por ordenador realizado en las regiones variables BA-1-3D de ratón, con respecto a los restos de aminoácidos en la región FR (isoleucina (I) en la posición 48, lisina (K) en la posición 66, alanina (A) en la posición 67, y valina (V) en la posición 71), que son adyacentes a las CDR de BA-1-3D VH y se supone que juegan un papel importante en el mantenimiento de las estructuras, se conservaron las de BA-1-3D VH y otras regiones FR se sustituyeron con las de las secuencias aceptoras humanas. Los números de posición de los restos de aminoácidos en VH se usaron de acuerdo con las definiciones de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación NIH N.º 91-3242, U. S. Department of Health and Human Services, 1991). El BA-1-3D VH humanizado así generado se denominó HuBA-1-3D VH1.

45 La lisina (K) en la posición 66 en BA-1-3D VH es adyacente a las secuencias de CDR. Como resultado del análisis más detallado de las regiones variables BA-1-3D mediante modelado por ordenador, se sugirió que la lisina (K) en la posición 66 en HuBA-1-3D VH1 podría sustituirse con arginina (R) en una posición correspondiente a U00503 VH sin afectar a la afinidad por el antígeno. Por lo tanto, con el fin de reducir la inmunogenicidad potencial, BA-1-3D VH humanizado, en el que la lisina (K) en la posición 66 de HuBA-1-3D VH1 fue sustituida con arginina (R), también se produjo. El BA-1-3D VH humanizado así sustituido se denominó HuBA-1-3D VH2.

La alineación de las secuencias de aminoácidos de BA-1-3D VH, HuBA-1-3D VH1, HuBA-1-3D VH2 y U00503 VH se muestra en la Figura 6.

55 Igualmente, para la humanización de BA-1-3D VL la secuencia de CDR de BA-1-3D VL se trasplantó a la posición correspondiente en Z46222 VL como un aceptor. Posteriormente, como resultado del análisis de estructuras tridimensionales mediante modelado por ordenador realizado en regiones variables BA-1-3D de ratón, con respecto a un resto de aminoácido en la región FR (valina (V) en la posición 48), que es adyacente a las CDR de BA-1-3D VL

y se supone que juega un papel importante en el mantenimiento de las estructuras, se conservó la de BA-1-3D VL y se sustituyeron otras regiones FR con las de las secuencias aceptoras humanas. Los números de posición de los restos de aminoácidos en VL se usaron de acuerdo con las definiciones de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación NIH N.º 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU. 1991). El BA-1-3D VL humanizado así producido se denominó HuBA-1-3D VL.

La alineación de las secuencias de aminoácidos de BA-1-3D VL, HuBA-1-3D VL y Z46622 VL se muestra en la Figura 7.

Los genes que codifican HuBA-1-3D VH1 y HuBA-1-3D VH2 se generaron por síntesis génica (GenScript USA, Piscataway, NJ) como exones, cada uno de los cuales comprendía un péptido señal de BA-1-3D VH de ratón y una señal de donante de corte y empalme derivada de una secuencia de una línea germinal humana JH3, a cuyos extremos se añadieron los sitios de enzima de restricción adecuados para la inserción de un vector de expresión de célula animal (SpeI añadido en el lado 5' terminal y HindIII añadido en el lado 3' terminal). Las secuencias génicas del gen HuBA-1-3D VH1 así generado y el gen HuBA-1-3D VH2, y las secuencias de aminoácidos de HuBA-1-3D VH1 y HuBA-1-3D VH2, se muestran en la Figura 8 y en la Figura 9, respectivamente.

Asimismo, se generó un gen que codifica HuBA-1-3D VL por síntesis génica (GenScript USA, Piscataway, NJ) como un exón, que comprendía un péptido señal de BA-1-3D VL de ratón y una señal de donante de corte y empalme derivada de una secuencia de una línea germinal humana Jk2 y a cuyos extremos se añadieron sitios de enzimas de restricción adecuados para la inserción de un vector de expresión de célula animal (NheI añadido al lado 5' terminal y EcoRI añadido al lado 3' terminal). La secuencia génica del gen HuBA-1-3D VL así generado y la secuencia de aminoácidos de HuBA-1-3D VL se muestran en la Figura 10.

Posteriormente, utilizando un sitio SpeI/HindIII para la inserción de los genes HuBA-1-3D VH1 y VH2, y también utilizando un sitio NheI/EcoRI para la inserción del gen HuBA-1-3D VL, estos sitios se insertaron cada uno en un animal vector de expresión de célula animal (Figura 5) que tiene las regiones constantes de la cadena γ 1 humana y la cadena κ . Específicamente, una combinación del gen HuBA-1-3D VH1 con el gen HuBA-1-3D VL y una combinación del gen HuBA-1-3D VH2 con el gen HuBA-1-3D VL se insertaron cada uno en el vector de expresión antes mencionado. Por lo tanto, se generaron un vector de expresión (pHuBA-1-3D-1) para expresar un anticuerpo humanizado BA-1-3D IgG1/x (HuBA-1-3D-1) constituido por HuBA-1-3D VH1 y HuBA-1-3D VL, y un vector de expresión (pHuBA-1-3D-2) para expresar un anticuerpo humanizado BA-1-3D IgG1/k (HuBA-1-3D-2) constituido por HuBA-1-3D VH2 y HuBA-1-3D VL, fueron generados.

Ejemplo 4

Generación de líneas celulares NS0 que producen de manera estable anticuerpos BA-1-3D quiméricos de ratón-humano (ChBA-1-3D) y anticuerpos BA-1-3D humanizados (HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2)

Una línea de células de mieloma de ratón NS0 (Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Salisbury, Wiltshire, RU) se cultivó a 37 °C en un medio DME que contenía 10 % de suero bovino fetal en un incubador con 7,5 % de CO₂. Con el fin de generar líneas celulares capaces de producir de forma estable ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2, se transfectaron 20 μ g de cada uno de los vectores de expresión génica del anticuerpo (pChBA-1-3D, pHuBA-1-3D-1 y pHuBA-1-3D-2) (previamente linealizado con una enzima de restricción FspI) en células NS0 (aproximadamente 10⁷ células) por electroporación de acuerdo con el método de Bebbington et al. (Bio/Technology 10: 169-175, 1992). Cuarenta y ocho horas después, el medio se intercambió con un medio selectivo (un medio DME que contenía FBS al 10 %, suplemento de medio HT (Sigma, St. Louis, MO), xantina 0,25 mg/ml y 1 μ g/ml de ácido micofenólico) y después, aproximadamente diez días después, se analizó la presencia o ausencia de un anticuerpo producido en un sobrenadante de cultivo.

Se detectaron ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 en el sobrenadante del cultivo y se midieron mediante un método de ELISA tipo sándwich. Específicamente, se añadió un anticuerpo policlonal específico de la cadena Fc γ de IgG humana de cabra (Sigma) diluido con PBS a una concentración de 1/2.000 en una cantidad de 100 μ l por pocillo a una placa de 96 pocillos, de modo que la placa de 96 pocillos se recubrió con el anticuerpo mencionado anteriormente a 4 °C durante la noche. Después de eso, la placa se lavó con un tampón de lavado (PBS + Tween 20 0,05 %). Posteriormente, se añadieron 300 μ l de un tampón de bloqueo (PBS + leche desnatada 2 % + Tween 20 0,05 %) a cada pocillo, de modo que la placa se bloqueó con el tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, la placa se lavó con un tampón de lavado y luego se añadieron a cada pocillo 100 μ l de un sobrenadante de cultivo diluido a una dilución de dilución adecuada con un tampón ELISA (PBS + leche desnatada 1 % + Tween 20 0,025 %). La mezcla obtenida se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se usó un anticuerpo anti-IgG1/k humano o humanizado como patrón. La mezcla de reacción se lavó con un tampón de lavado. A continuación, se añadieron 100 μ l de un anticuerpo policlonal anti-cadena kappa humana de cabra conjugado con HRP (Southern Biotech) que se había diluido con un tampón ELISA a una concentración de 1/2.000 como anticuerpo de detección para cada pocillo, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, lo resultante se lavó con un tampón de lavado, y luego se añadieron 100 μ l de un sustrato ABTS a cada pocillo para realizar una reacción de color. Después, se añadieron 100 μ l de ácido oxálico 2 % a cada

pocillo para terminar la reacción. Seguidamente se midió la absorbancia a 405 nm.

NS0-ChBA-1-3D 2A4, NS0-HuBA-1-3D-1 2D2 y NS0-HuBA-1-3D-2 3F7 se establecieron como líneas celulares NS0 que producen de forma estable anticuerpos ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2, respectivamente, y estas líneas celulares se aclimataron a un medio sin suero (Hybridoma SFM (Invitrogen)).

Las secuencias de la cadena H y de la cadena L de anticuerpos producidos por las líneas celulares individuales NS0-ChBA-1-3D 2A4, NS0-HuBA-1-3D-1 2D2 y NS0-HuBA-1-3D-2 3F7 fueron confirmadas por secuenciación del ADNc. Específicamente, primero se extrajo el ARN total de cada línea celular usando un reactivo TRIzol (Invitrogen) y, a continuación, usando cebadores oligo dT, se sintetizó el ADNc a partir del ARN total empleando SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) de acuerdo con el método incluido en el kit. Posteriormente, la región codificante de una cadena γ 1 humana se amplificó por PCR usando CMV2 y JNT098 como cebadores, y la secuenciación se llevó a cabo usando CMV2, JNT082, JNT097 y JNT098 como cebadores. Asimismo, la región codificante de una cadena κ 1 humana se amplificó por PCR usando CMV2 y JNT026 como cebadores, y la secuenciación se llevó a cabo usando CMV2 y JNT026 como cebadores. Debe observarse que los cebadores mencionados anteriormente (CMV2, JNT026, JNT082, JNT097 y JNT098) consisten cada uno en las secuencias de nucleótidos mostradas en la Figura 11.

Como resultado, las secuencias de ADNc de la cadena H y de la cadena L de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 producidas por las líneas celulares NS0 antes mencionadas se apareaban completamente con las correspondientes secuencias del ADNc de los vectores pChBA-1-3D, pHuBA-1-3D-1 y pHuBA-1-3D-2 (Figuras 12 a 16).

Ejemplo 5

Purificación de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2

Cada una de las líneas celulares NS0-ChBA-1-3D 2A4, NS0-HuBA-1-3D-1 2D2 y NS0-HuBA-1-3D-2 3F7 se cultivaron utilizando un frasco giratorio. Como medio, se usó Hybridoma-SFM (Invitrogen). En la etapa en la que se había alcanzado una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 células/ml, se añadió 60 mg/ml de hidrolizado de soja ultrafiltrado (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) (que se había disuelto en medio SFM4MAb (HyClone)) en una cantidad de 1/10 a las células. A continuación, el cultivo celular se llevó a cabo hasta que el porcentaje de células vivas fue del 50 % o menos. Se recuperó un sobrenadante de cultivo por centrifugación y filtración, y el sobrenadante celular recuperado se cargó en una columna de Proteína A-Sefarosa (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ). La columna se lavó con PBS y luego se llevó a cabo la elución con Glicina-HCl 0,1 M (pH 3,0). El anticuerpo se neutralizó con Tris-HCl 1M (pH 8,0), y el tampón se reemplazó entonces con PBS por diálisis. La concentración del anticuerpo se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm ($1 \text{ mg/ml} = 1,4 \text{ DO}$). Con respecto al rendimiento del anticuerpo por cultivo de 500 ml de cada línea celular NS0, se obtuvieron 6,1 mg de cada uno de ChBA-1-3D, 5,0 mg de HuBA-1-3D-1 y 3,8 mg de HuBA-1-3D-2.

Los anticuerpos purificados ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reducidas de acuerdo con un método ordinario. Como resultado, se confirmó una banda de cadena H de aproximadamente 50 kDa y una banda de cadena L de aproximadamente 25 kDa en todos los anticuerpos (Figura 17). Además, todos los anticuerpos tenían una pureza del 95 % o más después de la purificación.

Ejemplo 6

Caracterización de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2

La actividad de unión de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 a un antígeno (Dlk-1 humana) se analizó usando tres tipos diferentes de formatos de ELISA.

Como primer formato de ELISA, se llevó a cabo un ELISA para analizar una reacción monovalente de antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2, que se habían diluido cada uno con PBS a una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$, se añadieron cada uno en una cantidad de $100 \mu\text{l/pocillo}$ a una placa de 96 pocillos, seguido de un recubrimiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante la noche. La placa se lavó con un tampón de lavado y luego se bloqueó con un tampón de bloqueo. A continuación, la placa se lavó de nuevo con un tampón de lavado. Se produjo una serie de diluciones mezclando una proteína recombinante de la región extracelular hDlk-1 (hDlk-1-His) (Nakamura and Tajima, US2009/0326205 A1) con un tampón ELISA por dilución doble a partir de una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$, y luego se añadió la proteína recombinante así diluida en una cantidad de $100 \mu\text{l/pocillo}$ a la placa, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, la placa se lavó con un tampón de lavado, y se añadió un anticuerpo anti-etiqueta His de ratón conjugado con HRP (Hypromatrix, Worcester, MA) que se había diluido con un tampón ELISA a una concentración de $1/2.000$ en una cantidad de $100 \mu\text{l/pocillo}$ a la placa, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, el resultante se lavó con un tampón de lavado, y luego se añadieron $100 \mu\text{l}$ de un sustrato ABTS a cada pocillo para realizar una reacción de color. Después, se añadieron $100 \mu\text{l}$ de ácido oxálico 2 % a cada pocillo para terminar la reacción. Seguidamente, se midió

la absorbancia a 405 nm. Como resultado, las curvas de unión de hDlk-1-His a ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 se superpusieron completamente (Figura 18). Por lo tanto, se demostró que la afinidad antigénica de HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 retenía la afinidad antigénica de ChBA-1-3D, y que se logró con éxito la humanización de BA-1-3D.

5 Como segundo formato de ELISA, se añadió hDlk-1-His, que se había diluido con PBS a una concentración de 0,5 µg/ml, en una cantidad de 100 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos, seguido de recubrimiento a 4 °C durante la noche. La placa se lavó con un tampón de lavado y luego se bloqueó con un tampón de bloqueo. A continuación, la placa se lavó con un tampón de lavado de nuevo. ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2, en cada uno de los
10 cuales se produjo una serie de dilución de dos veces con un tampón ELISA a partir de una concentración de 5 µg/ml, se añadieron cada uno en una cantidad de 100 µl/pocillo a la placa, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, la placa se lavó con un tampón de lavado, y se añadió un anticuerpo policlonal anti-cadena kappa humana de cabra conjugado con HRP que se había diluido con un tampón ELISA a una
15 concentración de 1/2.000 en una cantidad de 100 µl/pocillo a la placa, seguido de la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se llevó a cabo una reacción de color por el mismo método que el descrito anteriormente. Como resultado, se determinó que los valores CE₅₀ de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 eran 116 ng/ml, 148 ng/ml y 154 ng/ml, respectivamente (Figura 19), y los anticuerpos humanizados HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 mostraron ambos una afinidad antigénica equivalente a la de ChBA-1-3D.

20 Como tercer formato de ELISA, se diluyó hDlk-1-His para recubrir una placa de 96 pocillos hasta una concentración de 1/10, y luego se añadió 0,05 µg/ml de hDlk-1-His en una cantidad de 100 µl/pocillo a la placa de 96 pocillos, seguido de un recubrimiento a 4 °C durante la noche, para producir una placa ELISA recubierta con una baja concentración de hDlk-1-His. Además de las operaciones antes mencionadas, la unión de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 a hDlk-1-His se midió de la misma manera que en el segundo formato de ELISA. Como resultado,
25 las actividades de unión de HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 se redujeron inesperadamente en comparación con ChBA-1-3D (Figura 20).

Como se demostró en el primer formato de ELISA, las actividades de unión monovalente de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 a hDlk-1-His no fueron sustancialmente diferentes entre sí (Figura 18). Además, como se
30 demostró en el segundo formato de ELISA, incluso en el caso del ELISA que implica el recubrimiento con una alta concentración de hDlk-1-His, las actividades de unión de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 a la proteína hDlk-1-His no fueron sustancialmente diferentes entre sí (Figura 18). En consecuencia, se consideró que los resultados del tercer formato de ELISA con respecto a una reducción en las actividades de unión de HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 a una baja concentración de hDlk-1-His en comparación con ChBA-1-3D (Figura 20) se obtuvieron
35 como consecuencia de una reducción de la avidéz (actividad de unión a antígeno) causada por una reducción de la flexibilidad en el movimiento de los dos brazos de unión de un anticuerpo humanizado a un antígeno. Como en el caso del segundo formato de ELISA, cuando la densidad de un antígeno es alta, todos los ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 pueden unirse divalentemente a un antígeno. En consecuencia, sus actividades de unión se detectan a niveles equivalentes (Figura 19). Como en el caso del ELISA de tercer formato, cuando la densidad de un
40 antígeno es baja, ChBA-1-3D puede unirse divalentemente a un antígeno. Sin embargo, HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 solo se pueden unir monovalentemente a un antígeno debido a su reducida avidéz. Por lo tanto, se consideró que HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2 mostraron actividades de unión a antígeno menores que las de ChBA-1-3D.

45 Ejemplo 7

Generación de mutantes de anticuerpo BA-1-3D humano y caracterización

Para determinar VH o VL, que causa una reducción en la avidéz de HuBA-1-3D-1 y HuBA-1-3D-2, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se sustituyó un fragmento del gen VBA HuBA-1-3D VL (Figura 10) intercalado entre los sitios de enzima de restricción NheI y EcoRI en un vector pHuBA-1-3D-2 con el fragmento NheI-EcoRI (Figura 4) de BA-1-3D VL de ratón para generar así un vector de expresión (pHuVH2/MuVL) constituido por
50 HuBA-1-3D VH2 y BA-1-3D VL de ratón, concretamente, con VH humanizada y VL de ratón (HuVH/MuVL). A continuación, se sustituyó un fragmento del gen HuBA-1-3D VH2 (Figura 9) intercalado entre los sitios de restricción de la enzima SpeI e HindIII en un vector pHuBA-1-3D-2 con el fragmento SpeI-HindIII (Figura 3) de BA-1-3D VH de ratón para generar así un vector de expresión (pMuVH/HuVL) constituido por BA-1-3D VH de ratón y HuBA-1-3D VL, concretamente, con VH de ratón y VL humanizada (MuVH/HuVL).

Posteriormente, los vectores de expresión pChBA-1-3D, pHuBA-1-3D-2, pHuVH2/MuVL y pMuVH/HuVL se transfectaron cada uno en células HEK293 utilizando reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el
60 método incluido con el reactivo. Las células resultantes se cultivaron a 37 °C en un medio DME que contiene suero fetal bovino 10 % en un incubador con CO₂ 7,5 durante varios días, y luego se recuperó un sobrenadante de cultivo. La concentración de un anticuerpo en el sobrenadante del cultivo se midió mediante el ELISA tipo sándwich mencionado anteriormente. La actividad de unión de cada uno de ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-2, HuVH2/MuVL y MuVH/HuVL a hDlk-1 se midió mediante el tercer formato de ELISA anteriormente mencionado (es decir, ELISA en el que hDlk-1-His se recubrió en una concentración de 0,05 µg/ml en la placa). Como resultado, las actividades de
65 unión de HuVH2/MuVL y HuBA-1-3D-2 a hDlk-1-His fueron débiles, mientras que la actividad de unión de

MuVH/HuVL a hDlk-1-His fue equivalente a la de ChBA-1-3D (Figura 21). Por lo tanto, se demostró que HuBA-1-3D VL no contribuye a una reducción de la avidéz y que HuBA-1-3D VH causa tal reducción en la avidéz.

Para recuperar la avidéz reducida, se realizó la sustitución de aminoácidos en HuBA-1-3D VH1. Como se muestra en la Figura 6, un total de 23 aminoácidos (número de aminoácidos 5, 9, 11, 12, 13, 16, 20, 24, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 73, 75, 82a, 82b, 83, 85, 87, 89 y 108 (que fueron asignados de acuerdo con las definiciones de Kabat et al., (1991)) fueron diferentes entre las alineaciones de las secuencias de aminoácidos de HuBA-1-3D VH1 y BA-1-3D VH de ratón. Por lo tanto, se generó un vector de expresión para un mutante (mutante pHuBA1-3D-1), en el que los aminoácidos con estos números de aminoácido en HuBA-1-3D VH1 se sustituyeron con los aminoácidos correspondientes en BA-1-3D VH de ratón.

Cabe señalar que, con respecto a los números de aminoácidos en las alineaciones que se muestran en la Figura 6, también hay números asignados que son similares a, pero se distinguen de 52 u 82 (por ejemplo, 52a, 82a, etc.), tales como 52 y 52a, 82 y 82a, 82b y 82c (esto también se aplica a la Figura 22). Por consiguiente, los números de aminoácidos usados en la Figura 6 (y Figura 22) son diferentes de los números de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS: 15, 35, 40, 67 y 73) de péptidos maduros de VH en cada figura. Dado que los números de los aminoácidos sustituidos se indican en función de las descripciones de los números de aminoácidos en la Figura 6 (y la Figura 22) (por ejemplo, T73K, etc.) en la presente memoria descriptiva y dibujos, por ejemplo, el aminoácido en la posición 73 en la Figura 6 (y la Figura 22) corresponde al aminoácido en la posición 74 en las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS: 15, 35 y 40) de los péptidos maduros de VH en las Figuras 1, 8 y 9 (lo mismo se aplica a los aminoácidos con otros números de aminoácidos o los números de aminoácidos de VL).

En la presente memoria, cada mutante de sustitución de aminoácido puede prepararse a partir del ADN que lo codifica basándose en los conocimientos técnicos comunes de una persona experta en la materia con respecto a la tecnología de recombinación génica. Para preparar cada mutante de sustitución, se puede introducir una mutación en el ADN mediante métodos conocidos tales como un método de Kunkel o un método del ADN dúplex discontinuo, utilizando kits de introducción de mutaciones que utilizan mutagénesis dirigida al sitio, como el sistema de mutagénesis dirigida al sitio GeneTailor™ (fabricado por Invitrogen) o el sistema de mutagénesis dirigida al sitio TaKaRa (Prime STAR (marca registrada) Mutagenesis Basal kit, Mutan-Super Express Km, etc., fabricado por Takara Bio Inc.). Se puede preparar un vector de expresión para cada mutante de sustitución, por ejemplo, introduciendo una mutación en el ADN que codifica HuBA-1-3D VH1 en un vector pHuBA1-3D-1.

La Figura 22 muestra los nombres de los 23 tipos generados de mutantes HuBA-1-3D VH1 (V5Q a T73K/T75S) y las secuencias de aminoácidos de los mismos (en las que solo se muestran los aminoácidos que son diferentes a los de la secuencia de aminoácidos de HuBA-1-3D VH1).

Los vectores de expresión para los mutantes individuales pHuBA-1-3D-1 se transfectaron cada uno en células HEK293, y luego, usando un sobrenadante de cultivo, se midió la actividad de unión de cada anticuerpo con sustitución de aminoácidos con hDlk-1 mediante el tercer formato de ELISA (es decir, el ELISA en el que se recubre la placa con una baja concentración de hDlk-1-His (0,05 µg/ml). Entre los 23 tipos de mutantes HuBA-1-3D VH1, se encontró que un mutante T73K (HuBA-1-3D-1-T73K) en el que la treonina (T) con el número de aminoácido número 73 se sustituyó con lisina (K), recuperaba su actividad de unión al antígeno, parcialmente pero aparentemente. Además, también se encontró que un mutante A24G (HuBA-1-3D-1-A24G) en el que la alanina (A) con el número de aminoácido 24 se sustituyó con glicina (G) también recuperaba su actividad de unión al antígeno (Figura 23). De los otros 21 tipos de mutantes, ninguno recuperó su actividad de unión al antígeno, en comparación con HuBA-1-3D-1, o bien la actividad de unión al antígeno recuperada solo se observaba ligeramente.

Además, para recuperar la avidéz reducida de HuBA-1-3D-1, se realizó una sustitución de dos aminoácidos (A24G/T73K), en la cual se combinó la sustitución de aminoácidos A24G con la sustitución de aminoácidos T73K, para generar un mutante (Figura 22). Además, anteriormente ya se había descrito que el 5.º aminoácido (V) y el 75.º aminoácido (T) estaban situados cerca del 73.º aminoácido en la estructura tridimensional de una región variable, y que el 11.º aminoácido (V) está contenido en una articulación esférica entre la VH y la CH de una cadena γ (Landolfi et al., J. Immunol. 166: 1748, 2001). Por lo tanto, se generaron los mutantes (V5Q/T73K, V11L/T73K y T73K/T75S), en los cuales el 5.º, 11.º y 75.º aminoácidos se sustituyeron con otros aminoácidos, así como la sustitución de T73K (Figura 22). Estos mutantes de sustitución de aminoácidos y sus vectores de expresión se prepararon por el mismo método que para la preparación de los 23 tipos de mutantes de sustitución de aminoácidos antes mencionados.

Los vectores de expresión (pHuBA-1-3D-1-A24G/T73K, pHuBA-1-3D-1-V5Q/T73K, pHuBA-1-3D-1-V11L/T73K y pHuBA-1-3D-1-T73K/T75S) para los 4 tipos de mutantes de sustitución de dos aminoácidos antes mencionados (HuBA-1-3D-1-A24G/T73K, HuBA-1-3D-1-V5Q/T73K, HuBA-1-3D-1-V11L/T73K and HuBA-1-3D-1-T73K/T75S) y los vectores de expresión pChBA-1-3D y pHuBA-1-3D-1 se transfectaron cada uno en células HEK293, y luego, usando un sobrenadante de cultivo, se midió la actividad de unión de cada anticuerpo con sustitución de aminoácido a hDlk-1 mediante el tercer formato de ELISA (es decir, el ELISA en el cual la placa se recubrió con una baja concentración de hDlk-1-His (0,05 µg/ml)). Como resultado, entre los 4 tipos de mutantes antes mencionados, el mutante A24G/T73K (HuBA-1-3D-1-A24G/T73K) exhibió una fuerte actividad de unión a hDlk-1-His, que era equivalente a ChBA-1-3D (Figura 23) y otros 3 tipos de mutantes apenas mejoraron a partir del mutante T73K (HuBA-1-3D-1-

T73K) como un mutante de sustitución de un aminoácido.

Ejemplo 8

5 Expresión, purificación y caracterización de HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K

Los vectores de expresión (pHuBA-1-3D-1-T73K y pHuBA-1-3D-1-A24G/T73K) para HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K como anticuerpos mutantes se transfectoron en células NS0 mediante el mismo método que el descrito en el Ejemplo 4, de modo que se pudo establecer una línea celular NS0 (NS0-HuBA-1-3D-1-T73K 3E12) que producía de forma estable las líneas celulares HuBA-1-3D-1-T73K y NS0 (NS0-HuBA-1-3D-1-A24G/T73K 2G3, NS0-HuBA-1-3D-1-A24G/T73K 5C7 y NS0-HuBA-1-3D-1-A24G/T73K 5F9) que producen de forma estable HuBA -1-3D-1-A24G/T73K. Las líneas celulares establecidas se adaptaron a un medio sin suero (Hybridoma SFM (Invitrogen)).

15 Las secuencias de la cadena H y la cadena L de un anticuerpo producido por cada una de estas líneas celulares NS0-HuBA-1-3D-1-T73K 3E12, NS0-HuBA-1-3D-1-A24G/T73K 2G3, NS0-HuBA-1-3D-1-A24G/T73K 5C7 and NS0-HuBA-1-3D-1-A24G/T73K 5F9 se confirmaron mediante secuenciación de ADNc que era el mismo método que el descrito en el Ejemplo 4. Las secuencias de ADNc de la cadena H y la cadena L de HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K producidas por las líneas celulares NS0 mencionadas anteriormente se aparearon completamente con las correspondientes secuencias del ADNc de los vectores pHuBA-1-3D-1-T73K y pHuBA-1-3D-1-A24G/T73K, respectivamente (Figuras 16, 24 y 25).

25 Las células NS0-HuBA-1-3D-1-T73K 3E12 y las células NS0-HuBA-1-3D-1-A24G/T73K 2G3 se cultivaron en un medio Hybridoma SFM por el mismo método que el descrito en el Ejemplo 5, y a continuación, se purificaron HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K de cada sobrenadante de cultivo usando una columna de Proteína A. El HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K purificados se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reducidas. Como resultado, se confirmó una cadena H de aproximadamente 50 kDa y una cadena L de aproximadamente 25 kDa (Figura 17), y la pureza de cada anticuerpo fue del 95 % o más.

30 Posteriormente, se analizó la avidéz (actividad de unión al antígeno) del ChBA-1-3D, HuBA-1-3D-1, HuBA-1-3D-1-T73K y HuBA-1-3D-1-A24G/T73K purificados a un antígeno mediante el tercer formato de ELISA anteriormente mencionado, en el cual hDlk-1-His se revistió en una concentración baja (0,05 µg/ml) en una placa de 96 pocillos. Como resultado, la actividad de unión al antígeno de HuBA-1-3D-1-T73K fue más fuerte que la de HuBA-1-3D-1, pero fue más débil que la del anticuerpo ChBA-1-3D. Por otro lado, el valor CE_{50} de HuBA-1-3D-A24G/T73K fue de 35,5 ng/ml, el cual era próximo al valor CE_{50} de ChBA-1-3D (25,4 ng/ml). Por lo tanto, se demostró que HuBA-1-3D-1-A24G/T73K tenía una avidéz mejorada, la cual se redujo en HuBA-1-3D-1, y por lo tanto que HuBA-1-3D-1-A24G/T73K adquirió una actividad de unión al antígeno equivalente a la de ChBA-1-3D (Figura 26).

Ejemplo 9

40 Generación de línea celular NS0 de alta producción de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K

La transfección del vector pHuBA-1-3D-1-A24G/T73K en células NS0, la construcción de una línea celular estable y la adaptación de la línea celular a un medio sin suero (Hybridoma SFM) se llevaron a cabo de la misma manera que se describió en el Ejemplo 4 y en el Ejemplo 8. NS0-HuBA-1-3D-1-A24G/T73K 8A3, una de las líneas celulares NS0 establecidas de alta producción del anticuerpo HuBA-1-3D-1-A24G/T73K, se cultivó en 37 °C en 40 ml de un medio Hybridoma SFM que contiene L-glutamina 2 mM y solución de Pluronic F-68 0,1 % (Sigma) en un matraz Erlenmeyer de plástico de 250 ml en un incubador con CO₂ 5 % , usando un agitador rotatorio y a un número de revoluciones de 100 rpm.

50 En el momento en que la densidad celular alcanzaba aproximadamente 2×10^6 células/ml, se añadió 35 mg/ml de Cell Boost 4 (HyClone) en una cantidad de 1/10 y una solución de Pluronic F-68 0,1 %. Dos días más tarde, se añadió 60 mg/ml de hidrolizado de soja ultrafiltrado (Irvine Scientific) diluido con un medio SFM4MAb (HyClone) en una cantidad de 1/10 y una solución de Pluronic F-68 0,1 % al medio, y el cultivo se continuó hasta que se obtuvo un porcentaje de células vivas de 50 % o menos. La concentración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en el sobrenadante del cultivo fue de 73 µg/ml.

60 Las secuencias de las cadenas H y L de un anticuerpo producido por células NS0-HuBA-1-3D-1-A24G/T73K 8A3 se confirmaron por secuenciación de ADNc, que era el mismo método que el descrito en el Ejemplo 4. Las secuencias así confirmadas se aparearon completamente con las correspondientes secuencias del ADNc del vector pHuBA-1-3D-1-A24G/T73K (Figuras 16 y 25).

Ejemplo 10

65 Examen de la estabilidad de unión al antígeno de HuBA-1-3-D-1-A24G/T73K

La estabilidad de unión al antígeno de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K como anticuerpo mutante se examinó mediante una prueba acelerada en una formulación líquida y una prueba de conservación en plasma de mono cinomolgo.

5 En primer lugar, se llevó a cabo una prueba acelerada en una formulación líquida de la siguiente manera. HuBA-1-3D-1-A24G/T73K se conservó en 3 tipos de tampones con diferentes valores de pH a 40 °C durante 1 mes. El tampón utilizado fue una solución que contenía glutamato de sodio 10 mM (Wako), D-sorbitol 262 mM (Wako) y Polisorbato 0,05 mg/ml (Wako), y esta solución se ajustó para tener 3 tipos de valores de pH, concretamente, pH 4,0, 5,5 y 7,0. Las concentraciones del anticuerpo en los tampones que tienen diferentes valores de pH fueron 0,977 mg/ml (pH 4,0), 0,996 mg/ml (pH 5,5) y 0,959 mg/ml (pH 7,0), y la conservación se inició a 40 °C. Después de la finalización de la conservación, cada muestra se conservó a -80 °C hasta la medición de la actividad de unión al antígeno. Además, como producto patrón de la actividad, se utilizó una muestra preparada conservando a -80 °C una solución de anticuerpo antes de la conservación a 40 °C durante 1 mes. Para la medición de la actividad de unión al antígeno, se llevaron a cabo análisis FACS y ELISA inmovilizado con antígeno. El análisis de FACS se llevó a cabo usando células HEK293-hDlk-1 preparadas permitiendo que un gen Dlk-1 humana de longitud completa se exprese de manera estable en células HEK293 (Nakamura y Tajima, US2009/0326205 A1). Las células se eliminaron de la placa de cultivo mediante un tratamiento con tripsina. A una suspensión celular de 5×10^5 células, se añadieron 100 μ l de una solución de anticuerpo preparada diluyendo la muestra de prueba acelerada o el producto patrón de actividad a una concentración de 10, 3, 1, 0,3 o 0,1 μ g/ml con un medio que contenía FCS 10 % como anticuerpo primario. La mezcla obtenida se incubó a 4 °C durante 20 minutos. A continuación, el producto de reacción se lavó con 1 ml de un medio que contenía FCS 10 % y al resultante se añadió 100 μ l de una solución de anticuerpo secundario que contenía un anticuerpo anti-Fc IgG humana marcado con biotina diluido 2000 veces (Rockland) y PE marcado con estreptavidina (BD Pharmingen) diluido 500 veces. La mezcla obtenida se incubó a 4 °C durante 20 minutos, y el producto de reacción se lavó después nuevamente con 1 ml de un medio que contenía FCS al 10 %. Después de eso, la muestra que contenía las células marcadas se suspendió en 1 ml de PBS que contenía FCS 1 % y EDTA 2 mM y la suspensión obtenida se analizó a continuación utilizando FACSCalibur (Becton Dickinson). Como resultado de la prueba acelerada a 40 °C durante 1 mes, las muestras exhibieron una actividad de unión al antígeno equivalente a la del producto patrón de actividad conservado a -80 °C en todos los tampones examinados con 3 tipos de valores de pH (Figura 27A).

30 Además, la medición de la actividad de unión al antígeno se llevó a cabo mediante ELISA inmovilizado con antígeno. El ELISA inmovilizado con antígeno se llevó a cabo de la siguiente manera. Una placa de 96 pocillos (BD FALCON) se recubrió con una proteína recombinante de la región extracelular de hDlk-1 (hDlk-1 His) que se había diluido con PBS a una concentración de 3 μ g/ml en una cantidad de 50 μ l/pocillo (4 °C, durante la noche). A continuación, la placa se lavó con un tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 0,01 %) y se añadió un tampón de bloqueo (PBS que contenía leche desnatada 2 % y Tween 20 0,05 %) en una cantidad de 200 μ l/pocillo a la placa, con el fin de bloquearlo (temperatura ambiente, 1 hora). Después de lavar la placa con un tampón de lavado, se diluyó un anticuerpo de prueba con un tampón ELISA (PBS que contiene leche desnatada 1 % y Tween 20 0,025 %) a concentraciones de 1, 0,1, 0,03, 0,01 y 0,001 μ g/ml, y después se añadió a cada solución de anticuerpo en una cantidad de 50 μ l/pocillo a la placa (temperatura ambiente, 2 horas). A continuación, la placa se lavó con un tampón de lavado y, como anticuerpo de detección, se añadió entonces un anticuerpo anti-cadena κ humana de cabra marcado con HRP (Southern Biotech) que se había diluido 2.000 veces con un tampón ELISA en una cantidad de 50 μ l/pocillo a la placa (temperatura ambiente, 1 hora). La placa se lavó con un tampón de lavado, y luego se añadió TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; SIGMA) como una solución de sustrato en una cantidad de 50 μ l/pocillo a la placa para realizar una reacción de color. Se añadió ácido sulfúrico 1 M en una cantidad de 25 μ l/pocillo a la placa para terminar la reacción. Posteriormente, empleando el lector de microplacas iMark (Bio Rad), se midió la absorbancia a 450 nm usando la absorbancia a 655 nm como referencia. Como resultado, al igual que con los resultados del análisis FACS, no se observó una disminución en la actividad debido a la conservación a 40 °C durante 1 mes en los tampones con los 3 tipos diferentes de valores de pH (Figura 27B).

50 A partir de estos resultados, quedó claro que HuBA-1-3D-1-A24G/T73K conserva una actividad de unión al antígeno estable en una formulación líquida.

A continuación, se examinó la actividad de unión al antígeno de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en plasma de mono cinomolgo mediante ELISA inmovilizado con antígeno. El plasma de mono cinomolgo utilizado fue plasma combinado, tratado con heparina, que se adquirió en Japan SLC, Inc. A continuación, el plasma de mono cinomolgo se conservó a -80 °C antes de su uso. Cuando se usó, el plasma de mono cinomolgo descongelado se centrifugó con una centrífuga pequeña (Beckman) a 12.000 rpm durante 5 minutos, y luego se usó el sobrenadante obtenido. Se preparó una muestra para usar en ELISA inmovilizado con antígeno de la siguiente manera. HuBA-1-3D-1-A24G/T73K se mezcló con plasma de mono cinomolgo para preparar una solución de 10 μ g/ml de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K, y la solución se incubó a 37 °C durante 1, 6, 24, 48 horas y 7 días. Las muestras que se habían incubado durante diferentes períodos de tiempo se conservaron a -80 °C antes de la medición. Como producto patrón de actividad, se usó una muestra inmediatamente después de prepararse como una solución 10 μ g/ml de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K. Tras la medición de la actividad de unión al antígeno, las muestras de medición descongeladas se centrifugaron cada una con una centrífuga pequeña (Beckman) a 12.000 rpm durante 5 minutos, y los sobrenadantes obtenidos se usaron a continuación. El ELISA inmovilizado con antígeno se llevó a cabo de la siguiente manera. Una placa de 96 pocillos (BD FALCON) se recubrió con una proteína recombinante (hDlk-1 His)

de la región extracelular de hDlk-1 que se había diluido con PBS a una concentración de 3 µg/ml en una cantidad de 50 µl/pocillo. (4 °C, durante la noche). A continuación, la placa se lavó con un tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 0,05 %) y se añadió un tampón de bloqueo (PBS que contenía caseína 1 %) en una cantidad de 200 µl/pocillo a la placa, para bloquearla (temperatura ambiente, 1 hora). Después de lavar la placa con un tampón de lavado, la muestra de medida se diluyó con un tampón de bloqueo a una concentración de 0,1 µg/ml, y la solución diluida se añadió luego en una cantidad de 50 µl/pocillo a la placa (temperatura ambiente, 1 hora). Posteriormente, la placa se lavó con un tampón de lavado y para la detección de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K, se añadió un anticuerpo anti-cadena κ humana de cabra marcado con HRP (Southern Biotech) que se había diluido 2.000 veces con un tampón de bloqueo en una cantidad de 50 µl/pocillo a la placa (temperatura ambiente, 1 hora). La placa se lavó con un tampón de lavado y luego se añadió TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; SIGMA) como una solución de sustrato en una cantidad de 50 µl/pocillo a la placa para realizar una reacción de color. Se añadió ácido sulfúrico 1 M en una cantidad de 25 µl/pocillo a la placa para terminar la reacción. A continuación, empleando el lector de microplacas iMark o el lector de microplacas Modelo 550 (Bio Rad), se midió la absorbancia a 450 nm usando la absorbancia a 655 nm como referencia. Como resultado, no se observó una disminución significativa en la actividad de unión al antígeno en HuBA-1-3D-1-A24G/T73K incluso después de la incubación durante 7 días (Figura 28). Por consiguiente, se demostró que HuBA-1-3D-1-A24G/T73K puede conservar una actividad de unión al antígeno estable en plasma de mono cinomolgo. Estos resultados sugirieron que HuBA-1-3D-1-A24G/T73K podría conservar una actividad de unión al antígeno estable también en plasma humano (en sangre humana).

Ejemplo 11

Actividad antitumoral del anticuerpo anti-Dlk-1 humana humanizado (HuBA-1-3D-1-A24G/T73K) *in vivo* (Este título también se aplica a los Ejemplos 11 a 16)

<Actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en modelos de tratamiento con xenoinjerto de células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano>

La actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K *in vivo* se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjertos que usan células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano, en las cuales hDlk-1 se expresó endógenamente en la superficie celular de las mismas.

Se trasplantaron células HepG2 (5×10^6 células) en el subcutis del flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 7 semanas de edad (Día 0). Nueve días después del trasplante (día 9), cuando el volumen del tumor medio alcanzó aproximadamente 100 mm^3 , los ratones se dividieron en un grupo de control (grupo de administración PBS, $N = 8$, $96,6 \pm 11,0 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (1 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $96,2 \pm 8,5 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (5 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $96,3 \pm 8,6 \text{ mm}^3$) y un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (10 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $96,2 \pm 8,5 \text{ mm}^3$). A partir del mismo día, el anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones a intervalos de una vez cada 3 días.

Como resultado, el 23.º día (día 23) después del trasplante de células cancerosas, el volumen del tumor fue de $900,1 \pm 248,6 \text{ mm}^3$ en el grupo control, mientras que se observó una actividad antitumoral extremadamente alta (actividad inhibidora de la formación tumoral) en todos los grupos de administración HuBA-1-3D-1-A24G/T73K con diferentes dosis. Es decir, el volumen del tumor fue de $93,4 \pm 47,3 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 89,6 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), fue de $102,6 \pm 39,7 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 88,6 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), y fue de $140,6 \pm 55,0 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 84,4 %, $P < 0,01$ mediante la prueba t de Student) (Figura 29A).

Del mismo modo, con respecto al peso del tumor en el 23.º día (día 23) después del trasplante de células cancerosas, el peso tumoral fue $0,440 \pm 0,105 \text{ g}$ en el grupo control, mientras que se observó una actividad antitumoral extremadamente alta (actividad inhibidora de la formación tumoral) en todos los grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K con diferentes dosis. Es decir, el peso tumoral fue de $0,030 \pm 0,026 \text{ g}$ en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (1 mg/kg de peso corporal) (tasa inhibitoria: 93,2 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), fue de $0,042 \pm 0,026 \text{ g}$ en el grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 90,5 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), y fue de $0,065 \pm 0,039 \text{ g}$ en el grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 85,1 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student) (Figura 29B).

Ejemplo 12

<Actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en modelos de tratamiento con xenoinjerto de células SK-N-F1 de neuroblastoma humano SK-N-F1>

La actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K *in vivo* se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células de neuroblastoma humano SK-N-F1, en las cuales hDlk-1 se expresó endógenamente en la superficie celular de las mismas.

Células SK-N-F1 (aproximadamente 5×10^6 células) se trasplantaron en el subcutis del flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 7 semanas de edad (Día 0). Trece días después del trasplante (día 13), cuando el volumen del tumor promedio alcanzó aproximadamente 100 mm^3 , los ratones se dividieron en un grupo de control (grupo de administración de PBS, $N = 8$, $91,7 \pm 18,3 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (1 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $91,9 \pm 16,9 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (5 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $91,5 \pm 16,5 \text{ mm}^3$), y un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (10 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $90,2 \pm 11,7 \text{ mm}^3$). A partir del mismo día, el anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones a intervalos de una vez cada 3 días.

Como resultado, en el 34.º día después del trasplante de las células cancerosas (día 34), el volumen del tumor fue de $1231,6 \pm 411,1 \text{ mm}^3$ en el grupo control, mientras que se observó una actividad antitumoral dependiente de la dosis (actividad inhibidora de la formación tumoral) en los grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K. Es decir, el volumen del tumor fue de $713,6 \pm 343,8 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 42,1 %, $P < 0,05$ en la prueba t de Student), fue de $317,0 \pm 160,6 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 74,3 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), y fue de $189,0 \pm 104,0 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 84,7 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student) (Figura 30A).

Del mismo modo, con respecto al peso del tumor en el 34.º día (día 34) después del trasplante de células cancerosas, el peso tumoral fue de $0,584 \pm 0,213 \text{ g}$ en el grupo control, mientras que se observó una actividad antitumoral dependiente de la dosis (actividad inhibidora de la formación tumoral) en los grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K. Es decir, el peso tumoral fue de $0,379 \pm 0,183 \text{ g}$ en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (1 mg/kg de peso corporal) (tasa inhibitoria: 64,8 %), fue de $0,165 \pm 0,115 \text{ g}$ en el grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 71,8 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), y fue de $0,093 \pm 0,059 \text{ g}$ en el grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 84,1 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student) (Figura 30B).

[Ejemplo 13]

<Evaluación de la eficacia farmacológica de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K a dosis bajas en modelos de tratamiento con xenoinjerto de células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano, y comparación con las eficacias farmacológicas del agente antineoplásico existente>

La actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K *in vivo* se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano, en las cuales hDik-1 se expresaba endógenamente en la superficie celular de las mismas. Al mismo tiempo, se comparó HuBA-1-3D-1-A24G/T73K con el "Nexavar" existente (comprimidos de tosilato de sorafenib, Bayer) aprobado como agente terapéutico para el cáncer de hígado, en términos de actividad antitumoral.

Se trasplantaron células HepG2 (5×10^6 células) en el subcutis del flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 7 semanas de edad (Día 0). Diez días después del trasplante (día 10), cuando el volumen del tumor medio alcanzó aproximadamente 100 mm^3 , los ratones se dividieron en un grupo de control (grupo de administración PBS, $N = 8$, $107,0 \pm 16,8 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (0,1 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $108,0 \pm 13,9 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (0,5 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $107,9 \pm 10,5 \text{ mm}^3$), y un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (1 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $107,9 \pm 10,0 \text{ mm}^3$). A partir del mismo día, el anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones a intervalos de una vez cada 3 días. Además, con respecto a un grupo de administración de Nexavar (40 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $107,7 \pm 9,7 \text{ mm}^3$) y un grupo de administración de Nexavar (80 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $107,9 \pm 9,6 \text{ mm}^3$), desde el mismo día, el agente se administró por vía oral a los ratones en un ciclo que consistía en 5 días a la semana de administración y 2 días a la semana de retirada del fármaco.

Como resultado, el 28.º día (día 28) después del trasplante de células cancerosas, el volumen del tumor fue de $945,2 \pm 562,1 \text{ mm}^3$ en el grupo de control, mientras que fue de $219,4 \pm 182,8 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 0,5 mg/kg de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (tasa inhibitoria: 76,8 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student) y fue de $116,5 \pm 69,2 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 1 mg/kg de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (tasa inhibitoria: 87,7 %, $P < 0,01$ en la prueba t de Student) (Figura 31A). Por lo tanto, se observó una actividad antitumoral extremadamente alta incluso a una dosis baja (0,5 mg/kg) en los casos de los grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K. La actividad antitumoral en los grupos de administración de Nexavar fue más débil que en los grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K. No se observó una actividad antitumoral significativa en el grupo de administración de 40 mg/kg de Nexavar ($588,0 \pm 314,0 \text{ mm}^3$) en comparación con el grupo de control, y fue de $384,1 \pm 190,4 \text{ mm}^3$ incluso en el grupo de administración de 80 mg/kg de Nexavar (tasa inhibitoria: 59,4 %, $P < 0,05$ en la prueba t de Student) (Figura 31B).

Como indicador de los efectos secundarios, con respecto a un cambio en los pesos corporales de los ratones después del trasplante de células cancerosas, se estableció el valor medio de los pesos corporales de los ratones en cada grupo en el momento de la agrupación (Día 10) al 100 %, y se examinó la tasa de aumento de los pesos

corporales de los ratones en cada grupo a lo largo del tiempo hasta el 28.º día (día 28). En el grupo control, se observó una disminución en el peso corporal de los ratones con el crecimiento del tumor ($93,0 \pm 8,5 \%$, $N = 8$, día 28). En los grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K, que exhibieron efectos antitumorales, no se observó una disminución tal de los pesos corporales de los ratones (grupo de administración de 0,5 mg/kg: $99,0 \pm 10,0 \%$, grupo de administración de 1 mg/kg: $100,0 \pm 4,2 \%$). En los grupos de administración de Nexavar, se observó una disminución en los pesos corporales con el tiempo, y la tasa de disminución del peso corporal el día 28 fue de $83,0 \pm 5,2 \%$ en el grupo de administración de 40 mg/kg de Nexavar ($N = 8$, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), y fue de $80,0 \pm 7,7 \%$ en el grupo de administración de 80 mg/kg de Nexavar ($N = 7$, $P < 0,05$ en la prueba t de Student) (Figura 31C). A partir de los resultados anteriores, se hizo evidente que el anticuerpo HuBA-1-3D-1-A24G/T73K tiene una actividad de inhibición casi completa del crecimiento tumoral incluso cuando se administra a una dosis tan baja como 0,5 mg/kg de peso corporal. Además, también quedó claro que el anticuerpo HuBA-1-3D-1-A24G/T73K exhibe una fuerte actividad antitumoral cuando se compara con Nexavar, un agente terapéutico existente para el cáncer de hígado, y no causa efectos secundarios.

15 Ejemplo 14

<Evaluación de las eficacias farmacológicas de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en modelos de tratamiento con xenoinjerto de células HepG2/C3A de carcinoma hepatocelular humano>

20 La actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K sobre el cáncer de hígado se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto utilizando células HepG2/C3A de carcinoma hepatocelular humano (ATCC, N.º Cat. CRL-10741).

25 Se trasplantaron células HepG2/C3A (5×10^6 células) en el subcutis del flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 7 semanas de edad (Día 0). Diez días después del trasplante (día 10), cuando el volumen del tumor medio alcanzó 100 mm^3 , los ratones se dividieron en un grupo control (grupo de administración de PBS, $N = 8$, $120,8 \pm 22,6 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (0,1 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $120,4 \pm 18,4 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (0,5 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $120,1 \pm 18,8 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (1 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $120,3 \pm 18,8 \text{ mm}^3$), y un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (5 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $120,6 \pm 21,0 \text{ mm}^3$). A partir del mismo día, el anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones a intervalos de una vez cada 3 días.

35 Como resultado, el 26.º día (día 26) después del trasplante de células cancerosas, el volumen del tumor fue de $637,6 \pm 353,9 \text{ mm}^3$ en el grupo de control ($N = 8$), mientras que se observó una actividad antitumoral estadísticamente significativa en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K de 1 mg/kg de peso corporal y en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K de 5 mg/kg. El volumen del tumor fue de $132,9 \pm 266,1 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: $79,2 \%$, $N = 8$, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), y fue de $128,0 \pm 75,6 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: $79,9 \%$, $N = 8$, $P < 0,01$ en la prueba t de Student) (Figura 32A).

45 Del mismo modo, con respecto al peso del tumor en el 26.º día (día 26) después del trasplante de células cancerosas, el peso tumoral fue de $0,624 \pm 0,381 \text{ g}$ en el grupo control, mientras que fue de $0,107 \pm 0,117 \text{ g}$ en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K de 1 mg/kg (tasa inhibitoria: $82,9 \%$, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), y fue de $0,079 \pm 0,056 \text{ g}$ en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K de 5 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: $87,3 \%$, $P < 0,01$ en la prueba t de Student), y por lo tanto, se confirmó una actividad antitumoral extremadamente fuerte (Figura 32B).

50 Ejemplo 15

<Evaluación de las eficacias farmacológicas de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en modelos de tratamiento con xenoinjerto de células Lu-135 de cáncer de pulmón microcítico humano>

55 La actividad antitumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en el cáncer de pulmón microcítico se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto utilizando células humanas de cáncer de pulmón microcítico Lu-135 (adquiridas en Health Science Research Resources Bank, Japón Health Sciences Foundation, N.º Cat JCRB0170), en las cuales hDlk-1 se expresó endógenamente en la superficie celular de las mismas.

60 Se trasplantaron células Lu-135 (5×10^6 células) en el subcutis del flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 7 semanas de edad (Día 0). Diez días después del trasplante (día 10), cuando el volumen del tumor medio alcanzó aproximadamente 100 mm^3 , los ratones se dividieron en un grupo control (grupo de administración de PBS, $N = 8$, $100,9 \pm 12,7 \text{ mm}^3$), un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (1 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $100,6 \pm 8,1 \text{ mm}^3$), y un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (10 mg/kg de peso corporal) ($N = 8$, $102,9 \pm 12,0 \text{ mm}^3$). A partir del mismo día, el anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones a intervalos de una vez cada 3 días. Como resultado, en el 34.º día (día 34) después del trasplante de células cancerosas, el volumen del tumor fue de $972,7 \pm 266,8 \text{ mm}^3$ en el grupo de control, mientras que fue de $631,9 \pm$

218,9 mm³ en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K de 1 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 35,0 %, P <0,05 en la prueba t de Student), y fue de 582,3 ± 220,4 mm³ en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K de 10 mg/kg de peso (tasa inhibitoria: 40,1 %, P <0,05 en la prueba t de Student). Por lo tanto, se confirmó una actividad antitumoral estadísticamente significativa en los grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (Figura 33A).

Del mismo modo, con respecto al peso del tumor en el 34.º día (día 34) después del trasplante de células cancerosas, el peso tumoral fue de 0,632 ± 0,177 g en el grupo control, mientras que fue de 0,429 ± 0,161 g en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K de 1 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 32,1 %, P <0,05 en la prueba t de Student), y fue de 0,420 ± 0,178 g en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K de 10 mg/kg de peso corporal (tasa inhibitoria: 33,5 %, P <0,05 en la prueba t de Student). Por lo tanto, se confirmó una actividad antitumoral estadísticamente significativa en los grupos de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (Figura 33B).

Ejemplo 16

<Inducción de apoptosis en células cancerosas mediante la administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K en modelos de tratamiento con xenoinjerto de células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano>

A continuación, con respecto al mecanismo de acción de la actividad antitumoral exhibida por HuBA-1-3D-1-A24G/T73K, se examinó la apoptosis de células cancerosas en tumores de xenoinjerto después de la administración del anticuerpo mediante un método TUNEL y un método inmunohistoquímico usando un anticuerpo anti-caspasa-3 escindida.

Se trasplantaron células HepG2 (5 × 10⁶ células) en el subcutis del flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 7 semanas de edad. Cuando el volumen del tumor promedio alcanzó 200 mm³, los ratones se dividieron en un grupo control (grupo de administración de PBS) y un grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (5 mg/kg de peso corporal). Cuarenta y ocho horas después de la administración de PBS, se recuperaron tumores de xenoinjerto del grupo control (N = 3). Veinticuatro y cuarenta y ocho horas después de la administración del anticuerpo, se recuperaron tumores de xenoinjerto del grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (N = 3 en cada tiempo). Los tumores de xenoinjerto así recuperados se incluyeron en el Compuesto O.C.T. (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Funakoshi), y los bloques congelados se prepararon a continuación en nitrógeno líquido. Los cortes congelados de los tumores de xenoinjerto se produjeron en un criostato y la apoptosis de las células cancerosas se detectó mediante el método TUNEL de acuerdo con un método descrito en TumorTACS™ *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Trevigen, 4815-30-K).

Los cortes congelados preparadas se secaron completamente al aire a temperatura ambiente, y luego se rehidrataron con una serie de etanol, seguido de inmovilización con PBS que contenía formaldehído 3,7 % (Wako, 064-00406). El resultante se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos dos veces, y luego se permeabilizó con Cytonin (Trevigen, 4876-05-01). Posteriormente, el resultante se lavó dos veces con agua destilada a temperatura ambiente durante 2 minutos y luego se trató con una solución preparada añadiendo una solución de peróxido de hidrógeno (Wako, 081-04215) a metanol hasta una concentración final del 3 % a temperatura ambiente durante 5 minutos, para eliminar la peroxidasa endógena. A continuación, el residuo se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 1 minuto, y luego se pretrató con una solución preparada diluyendo 10 veces 10 x TdT Tampón marcador (Trevigen, 4810-30-02) con agua destilada (en lo sucesivo referido como "1 x TdT Tampón marcador"). El resultante se dejó reaccionar con Labeling Reaction Mix producido mezclando TdT dNTP Mix (Trevigen, 4810-30-04), 50 x Mn²⁺ (Trevigen, 4810-30-14), TdT Enzyme (Trevigen, 4810-30-05) y 1 x TdT Tampón marcador, de acuerdo con un manual de instrucciones incluido en el TumorTACS™ *In Situ* Apoptosis Detection Kit a 37 °C durante 1 hora, y se añadió dNTP marcado con biotina al ADN fragmentado. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó reaccionar con una solución preparada diluyendo 10 veces 10 x tampón de detención (Trevigen, 4810-30-03) con agua destilada a temperatura ambiente durante 5 minutos, para terminar la reacción de marcado. A continuación, la mezcla de reacción se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 2 minutos dos veces, y luego se dejó reaccionar con una solución preparada diluyendo 50 veces Strep-HRP (Trevigen, 4800-30-06) con PBS a temperatura ambiente durante 10 minutos, formando así un complejo ABC. El complejo ABC así obtenido se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 2 minutos dos veces, y el desarrollo de color se llevó a cabo utilizando una solución DAB preparada mezclando PBS, DAB (Trevigen, 4800-30-09) y una solución de peróxido de hidrógeno 30 % de acuerdo con un manual de instrucciones incluido en el TumorTACS™ *In Situ* Apoptosis Detection Kit. Después de la confirmación del desarrollo del color, la mezcla de reacción se lavó con agua desionizada durante 2 minutos 4 veces, y el núcleo se tiñó con verde metilo 1 % (Trevigen, 4800-30-18). Posteriormente, el resultante se deshidrató con etanol, luego se penetró con xileno, y luego se montó en Entellan New (MERCK, 1079610100), seguido de observación bajo un microscopio. Un corte de tejido, en el que el 10 % o más de todas las células cancerosas se tiñeron en el corte de tejido, se definió como un corte positivo.

Como resultado, en tumores de xenoinjerto en el grupo de control (grupo de administración de PBS, N = 3), no se observaron células cancerosas en las que se indujo la apoptosis positiva a TUNEL. Por el contrario, en el grupo de administración de HubA-1-3D-1-A24G/T73K de 5 mg/kg de peso corporal, 24 horas después de la administración del

anticuerpo, se observaron células cancerosas en las que se indujo apoptosis positiva a TUNEL. Cuarenta y ocho horas después de la administración del anticuerpo, dicha apoptosis se observó en el 30 % o más de todas las células cancerosas en los tres casos (Figura 34A).

5 Asimismo, la apoptosis de células cancerosas en tumores de xenoinjerto se examinó mediante inmunotinción con caspasa-3 activada. Los cortes congelados se fijaron por tratamiento con PBS que contenía paraformaldehído 4 % (Wako, 160-16061) a 4 °C durante 15 minutos. El resultante se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos dos veces, y luego se trató a temperatura ambiente durante 10 minutos con una solución preparada añadiendo una solución de peróxido de hidrógeno (Wako, 081-04215) a metanol hasta una concentración final del 3
10 %, para eliminar la peroxidasa endógena. A continuación, el resultante se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos dos veces, y luego se bloqueó con PBS que contenía 1,5 % de suero de cabra normal (Vector, S-1000) (durante 1 hora a temperatura ambiente).

15 Posteriormente, el resultante se dejó reaccionar con un anticuerpo anti-caspasa-3 escindida (Cell Signaling Technology, N.º cat 9661) que se había diluido 600 veces con un tampón de bloqueo a 4 °C durante la noche, y luego se le permitió reaccionar con Reactivo de polímero ChemMate EnVision (DAKO, K5027) a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, el resultante se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos tres veces, y seguidamente se llevó a cabo el desarrollo de color utilizando la solución Histofine Peroxidase Substrate Simple Stain DAB (Nichirei Bioscience, 415171). El resultante se lavó con agua desionizada durante 5
20 minutos, y el núcleo se tiñó luego con la Solución de Hematoxilina de Mayer (Wako, 131-09665). Posteriormente, la resultante se deshidrató con etanol, luego se penetró con xileno, y luego se montó en Entellan New (MERCCK, 1079610100), seguido de observación bajo un microscopio. Un corte de tejido, en el cual el 10 % o más de todas las células cancerosas se tiñeron en el corte de tejido, se definió como un corte positivo.

25 Como resultado, en tumores de xenoinjerto en el grupo de control (grupo de administración de PBS, N = 3), no se detectó caspasa-3 activada. Por el contrario, en el grupo de administración de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K (5 mg/kg de peso corporal), 24 horas después de la administración del anticuerpo, se indujo apoptosis caspasa-3 positiva en células cancerosas en 2 de 3 casos, y 48 horas después de la administración del anticuerpo, dicha inducción de la apoptosis activada por caspasa-3 positiva en células cancerosas se observó en los 3 casos. En particular, en los
30 tumores de xenoinjerto 48 horas después de la administración del anticuerpo, se observó muerte celular causada por apoptosis activada por caspasa-3 positiva en 80 % o más de todas las células cancerosas (Figura 34B).

A partir de los resultados anteriores, quedó claro que HuBA-1-3D-1-A24G/T73K induce la muerte celular causada por la apoptosis en células HepG2 de carcinoma hepatocelular, y se demostró que este es al menos uno de los
35 mecanismos de acción de la actividad anti-tumoral de HuBA-1-3D-1-A24G/T73K.

Aplicabilidad industrial

40 De acuerdo con la presente invención, se pueden proporcionar anticuerpos anti-hDlk-1 que tienen una actividad antitumoral, específicamente, anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 que tienen una actividad antitumoral significativa in vivo incluso mediante la administración de anticuerpos solos, y particularmente, los anticuerpos mencionados anteriormente, que son anticuerpos humanizados. Además, entre los anticuerpos humanizados, la presente invención puede proporcionar anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 humanizados de tipo sustitución de
45 aminoácidos, que se han modificado para tener una mayor avidéz (actividad de unión al antígeno).

Además, la presente invención puede proporcionar hibridomas que producen los anticuerpos mencionados anteriormente, y un complejo de los anticuerpos mencionados anteriormente y diversos tipos de agentes.

50 Además, la presente invención también puede proporcionar una composición farmacéutica para diagnosticar o tratar un tumor, una composición farmacéutica para inducir apoptosis en células tumorales, un agente terapéutico anti-tumoral, un agente de diagnóstico tumoral, un agente para inducir apoptosis en células tumorales, un método para tratar un tumor, un método para detectar un tumor, un kit para detectar o diagnosticar un tumor y un kit para inducir apoptosis en células tumorales, cada uno de los cuales comprende el anticuerpo mencionado anteriormente, el complejo mencionado anteriormente o similar.

55

TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NOS: 3 a 11	ADN sintéticos
SEQ ID NO: 26	ADN recombinante
SEQ ID NO: 27	ADN recombinante
SEQ ID NO: 32	ADN recombinante
SEQ ID NO: 33	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 34	ADN recombinante
SEQ ID NO: 35	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 36	ADN recombinante
SEQ ID NO: 37	ADN recombinante
SEQ ID NO: 38	Proteína recombinante

SEQ ID NO: 39	ADN recombinante
SEQ ID NO: 40	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 41	ADN recombinante
SEQ ID NO: 42	ADN recombinante
SEQ ID NO: 43	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 44	ADN recombinante
SEQ ID NO: 45	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 46	ADN recombinante
SEQ ID NOS: 47 a 51	ADN sintéticos
SEQ ID NO: 52	ADN recombinante
SEQ ID NO: 53	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 54	ADN recombinante
SEQ ID NO: 55	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 56	ADN recombinante
SEQ ID NO: 57	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 58	ADN recombinante
SEQ ID NO: 59	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 60	ADN recombinante
SEQ ID NO: 61	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 62	ADN recombinante
SEQ ID NO: 63	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 64	ADN recombinante
SEQ ID NO: 65	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 66	ADN recombinante
SEQ ID NO: 67	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 68	ADN recombinante
SEQ ID NO: 69	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 70	ADN recombinante
SEQ ID NO: 71	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 72	ADN recombinante
SEQ ID NO: 73	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 74	ADN recombinante
SEQ ID NO: 75	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 76	ADN recombinante
SEQ ID NO: 77	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 78	ADN recombinante
SEQ ID NO: 79	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 80	ADN recombinante
SEQ ID NO: 81	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 82	ADN recombinante
SEQ ID NO: 83	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 84	ADN recombinante
SEQ ID NO: 85	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 86	ADN recombinante
SEQ ID NO: 87	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 88	ADN recombinante
SEQ ID NO: 89	Proteína recombinante

Listado de secuencias

- 5 <110> LivTech, Inc.
- <120> ANTICUERPO ANTI-DLK-1 CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL IN VIVO
- <130> PCT13-0032
- 10 <150> US61/709.282
- <151> 03-10-2012
- <160> 89
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1532
- <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

5 <222> (154)..(1305)

<400> 1

```

gagagcgcag cgcgcagccc ggtgcagccc tggctttccc ctgcctgcgc gcccgcgccc      60
cctttcgcgt ccgcaaccag aagcccagtg cggcgcagc agccggaccc gcgcccgcac      120
cgctcccggg acccgcgaccc cggccgccc gag atg acc gcg acc gaa gcc ctc      174
                               Met Thr Ala Thr Glu Ala Leu
                               1                               5

ctg cgc gtc ctc ttg ctc ctg ctg gct ttc gcc cac agc acc tat ggg      222
Leu Arg Val Leu Leu Leu Leu Leu Ala Phe Gly His Ser Thr Tyr Gly
                               10                               15                               20

gct gaa tgc ttc ccg gcc tgc aac ccc caa aat gga ttc tgc gag gat      270
Ala Glu Cys Phe Pro Ala Cys Asn Pro Gln Asn Gly Phe Cys Glu Asp
                               25                               30                               35

gac aat gtt tgc agg tgc cag cct gcc tgg cag ggt ccc ctt tgt gac      318
Asp Asn Val Cys Arg Cys Gln Pro Gly Trp Gln Gly Pro Leu Cys Asp
                               40                               45                               50                               55

cag tgc gtg acc tct ccc gcc tgc ctt cac gga ctc tgt gga gaa ccc      366
Gln Cys Val Thr Ser Pro Gly Cys Leu His Gly Leu Cys Gly Glu Pro
                               60                               65                               70

ggg cag tgc att tgc acc gac gcc tgg gac ggg gag ctc tgt gat aga      414
Gly Gln Cys Ile Cys Thr Asp Gly Trp Asp Gly Glu Leu Cys Asp Arg
                               75                               80                               85

gat gtt cgg gcc tgc tcc tcg gcc ccc tgt gcc aac aac ggg acc tgc      462
Asp Val Arg Ala Cys Ser Ser Ala Pro Cys Ala Asn Asn Gly Thr Cys
                               90                               95                               100

gtg agc ctg gac gat gcc ctc tat gaa tgc tcc tgt gcc ccc ggg tac      510
Val Ser Leu Asp Asp Gly Leu Tyr Glu Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr
                               105                               110                               115

tcg gga aag gac tgc cag aaa aag gac ggg ccc tgt gtg atc aac gcc      558

```

ES 2 665 341 T3

Ser	Gly	Lys	Asp	Cys	Gln	Lys	Lys	Asp	Gly	Pro	Cys	Val	Ile	Asn	Gly			
120					125					130					135			
tcc	ccc	tgc	cag	cac	gga	ggc	acc	tgc	gtg	gat	gat	gag	ggc	cgg	gcc			606
Ser	Pro	Cys	Gln	His	Gly	Gly	Thr	Cys	Val	Asp	Asp	Glu	Gly	Arg	Ala			
			140						145					150				
tcc	cat	gcc	tcc	tgc	ctg	tgc	ccc	cct	ggc	ttc	tca	ggc	aat	ttc	tgc			654
Ser	His	Ala	Ser	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Gly	Asn	Phe	Cys			
			155					160					165					
gag	atc	gtg	gcc	aac	agc	tgc	acc	ccc	aac	cca	tgc	gag	aac	gac	ggc			702
Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Ser	Cys	Thr	Pro	Asn	Pro	Cys	Glu	Asn	Asp	Gly			
		170					175					180						
gtc	tgc	act	gac	att	ggg	ggc	gac	ttc	cgc	tgc	cgg	tgc	cca	gcc	ggc			750
Val	Cys	Thr	Asp	Ile	Gly	Gly	Asp	Phe	Arg	Cys	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly			
	185					190					195							
ttc	atc	gac	aag	acc	tgc	agc	cgc	ccg	gtg	acc	aac	tgc	gcc	agc	agc			798
Phe	Ile	Asp	Lys	Thr	Cys	Ser	Arg	Pro	Val	Thr	Asn	Cys	Ala	Ser	Ser			
200					205					210					215			
ccg	tgc	cag	aac	ggg	ggc	acc	tgc	ctg	cag	cac	acc	cag	gtg	agc	tac			846
Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Leu	Gln	His	Thr	Gln	Val	Ser	Tyr			
				220					225					230				
gag	tgt	ctg	tgc	aag	ccc	gag	ttc	aca	ggt	ctc	acc	tgt	gtc	aag	aag			894
Glu	Cys	Leu	Cys	Lys	Pro	Glu	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	Cys	Val	Lys	Lys			
			235					240					245					
cgc	gcg	ctg	agc	ccc	cag	cag	gtc	acc	cgt	ctg	ccc	agc	ggc	tat	ggg			942
Arg	Ala	Leu	Ser	Pro	Gln	Gln	Val	Thr	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Tyr	Gly			
		250					255					260						
ctg	gcc	tac	cgc	ctg	acc	cct	ggg	gtg	cac	gag	ctg	ccg	gtg	cag	cag			990
Leu	Ala	Tyr	Arg	Leu	Thr	Pro	Gly	Val	His	Glu	Leu	Pro	Val	Gln	Gln			
	265					270					275							
ccg	gag	cac	cgc	atc	ctg	aag	gtg	tcc	atg	aaa	gag	ctc	aac	aag	aaa			1038
Pro	Glu	His	Arg	Ile	Leu	Lys	Val	Ser	Met	Lys	Glu	Leu	Asn	Lys	Lys			
280					285					290					295			
acc	cct	ctc	ctc	acc	gag	ggc	cag	gcc	atc	tgc	ttc	acc	atc	ctg	ggc			1086
Thr	Pro	Leu	Leu	Thr	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Cys	Phe	Thr	Ile	Leu	Gly			
				300					305					310				
gtg	ctc	acc	agc	ctg	gtg	gtg	ctg	ggc	act	gtg	ggt	atc	gtc	ttc	ctc			1134
Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Val	Val	Leu	Gly	Thr	Val	Gly	Ile	Val	Phe	Leu			
			315					320					325					
aac	aag	tgc	gag	acc	tgg	gtg	tcc	aac	ctg	cgc	tac	aac	cac	atg	ctg			1182
Asn	Lys	Cys	Glu	Thr	Trp	Val	Ser	Asn	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Met	Leu			
		330					335					340						
cgg	aag	aag	aag	aac	ctg	ctg	ctt	cag	tac	aac	agc	ggg	gag	gac	ctg			1230
Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Leu	Leu	Leu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Gly	Glu	Asp	Leu			
			345			350					355							
gcc	gtc	aac	atc	atc	ttc	ccc	gag	aag	atc	gac	atg	acc	acc	ttc	agc			1278
Ala	Val	Asn	Ile	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Ile	Asp	Met	Thr	Thr	Phe	Ser			
360					365					370					375			

ES 2 665 341 T3

aag gag gcc ggc gac gag gag atc taa gcagcgttcc cacagccccc 1325
 Lys Glu Ala Gly Asp Glu Glu Ile
 380

tctagattct tggagttccg cagagcttac tatacgcggg ctgtcctaata ctttgtggtg 1385

ttcgctatct cttgtgtcaa atctggtgaa cgctacgctt acatatattg tctttgtgct 1445

gctgtgtgac aaacgcaatg caaaaacaat cctctttctc tctcttaatg catgatacag 1505

aataataata agaatttcat cttaaaa 1532

5 <210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Met Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Arg Val Leu Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Phe Gly His Ser Thr Tyr Gly Ala Glu Cys Phe Pro Ala Cys Asn Pro
 20 25 30

Gln Asn Gly Phe Cys Glu Asp Asp Asn Val Cys Arg Cys Gln Pro Gly
 35 40 45

Trp Gln Gly Pro Leu Cys Asp Gln Cys Val Thr Ser Pro Gly Cys Leu
 50 55 60

His Gly Leu Cys Gly Glu Pro Gly Gln Cys Ile Cys Thr Asp Gly Trp
 65 70 75 80

Asp Gly Glu Leu Cys Asp Arg Asp Val Arg Ala Cys Ser Ser Ala Pro
 85 90 95

Cys Ala Asn Asn Gly Thr Cys Val Ser Leu Asp Asp Gly Leu Tyr Glu
 100 105 110

Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Ser Gly Lys Asp Cys Gln Lys Lys Asp
 115 120 125

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

Val Asp Asp Glu Gly Arg Ala Ser His Ala Ser Cys Leu Cys Pro Pro
 145 150 155 160

Gly Phe Ser Gly Asn Phe Cys Glu Ile Val Ala Asn Ser Cys Thr Pro
 165 170 175

10

ES 2 665 341 T3

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

<210> 3
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN sintético

<400> 3
 ctaatagcgc tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

5
 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético

10
 <400> 4
ctaatacgcac tcactatagg gc 22

15
 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético

20
 <400> 5
aagcagtggat atcaacgcag agt 23

25
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético

30
 <400> 6
gccagtggat agaccgatgg 20

35
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético

40
 <400> 7
gatggataca gttggtgcag c 21

45
 <210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético

50
 <400> 8
gcaactagta ccaccatggg ttggagctgt atc 33

55
 <210> 9
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético

60

ES 2 665 341 T3

<400> 9
 ggggaagcttg agaggccatt cttacctgag gagacggtga ctgaggt 47

5
 <210> 10
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> ADN sintético

<400> 10
 gctgctagca ccaccatgga atcacagacc cag 33

15
 <210> 11
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> ADN sintético

<400> 11
 gcagaattca gaaaagtga cttacgtttc agctccagct tggccc 46

25
 <210> 12
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)

35
 <400> 12

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggt 48
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

gtg cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct ggg cct gag ctg gtg agg 96
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg
 20 25 30

cct ggg gtc tca gtg aag att tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc 144
 Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

act gat tat gct atg cac tgg gtg aag cag agt cat gca aag agt cta 192
 Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
 50 55 60

gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac 240

ES 2 665 341 T3

Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80
cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gta gac aaa tcc tcc agc 288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95
aca gcc tat atg gaa ctt gcc aga ttg aca tct gag gat tct gcc atc 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile
100 105 110
tat tac tgt gca aga gga gga tta cga gag tat tac tat gct atg gac 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
115 120 125
tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 13
<211> 140
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 13

5

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

10

ES 2 665 341 T3

<210> 14
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

10

<400> 14

```

cag gtc cag ctg cag cag tct ggg cct gag ctg gtg agg cct ggg gtc      48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1                               5                               10                               15

tca gtg aag att tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat      96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
                20                               25                               30

gct atg cac tgg gtg aag cag agt cat gca aag agt cta gag tgg att      144
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
                35                               40                               45

gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac cag aag ttt      192
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
                50                               55                               60

aag ggc aag gcc aca atg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tat      240
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                               70                               75                               80

atg gaa ctt gcc aga ttg aca tct gag gat tct gcc atc tat tac tgt      288
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                               90                               95

gca aga gga gga tta cga gag tat tac tat gct atg gac tac tgg ggt      336
Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
                100                               105                               110

caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca      363
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
                115                               120
  
```

15

<210> 15
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 15

```

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

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

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
                35                               40                               45
  
```

ES 2 665 341 T3

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 16

10 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

15 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 17

Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

20 Gly
 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 18

Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 19
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(399)
 <400> 19

ES 2 665 341 T3

atg gaa tca cag acc cag gtc ctc atg ttt ctt ctg ctc tgg gta tct	48
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser	
1 5 10 15	
ggt gcc tgt gca gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc ctg gct	96
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala	
20 25 30	
atg tca gta gga cag aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agc	144
Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctt tta aat agt agc aat caa aag aac tat ttg gcc tgg tac cag cag	192
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln	
50 55 60	
aaa cca gga cag tct cct aaa ctt ctg gta tac ttt gca tcc act agg	240
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg	
65 70 75 80	
gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc ata ggc agt gga tct ggg aca gat	288
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	
85 90 95	
ttc act ctt acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gat tac	336
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr	
100 105 110	
ttc tgt cag caa cat tat agc act cct ccc acg ttc ggt gct ggg acc	384
Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr	
115 120 125	
aag ctg gag ctg aaa	399
Lys Leu Glu Leu Lys	
130	

<210> 20
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 20

5

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

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

Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys
130

5 <210> 21
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)
 <400> 21

ES 2 665 341 T3

gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc ctg gct atg tca gta gga	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly	
1 5 10 15	
cag aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agc ctt tta aat agt	96
Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser	
20 25 30	
agc aat caa aag aac tat ttg gcc tgg tac cag cag aaa cca gga cag	144
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
35 40 45	
tct cct aaa ctt ctg gta tac ttt gca tcc act agg gaa tct ggg gtc	192
Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
50 55 60	
cct gat cgc ttc ata ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctt acc	240
Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
65 70 75 80	
atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gat tac ttc tgt cag caa	288
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln	
85 90 95	
cat tat agc act cct ccc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg	336
His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu	
100 105 110	
aaa	339
Lys	

<210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 22

5

ES 2 665 341 T3

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

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

<210> 23
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 23

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

10 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 24

Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

20 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*
 <400> 25

ES 2 665 341 T3

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
 1 5

5 <210> 26
 <211> 455
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante
 <400> 26

actagtagca ccatggggtg gagctgtatc atcttctttc tggtagcaac agctacaggt 60
gtgcactccc aggtccagct gcagcagtct gggcctgagc tggtagggcc tggggctctca 120
gtgaagattt cctgcaaggg ttccggctac acattcactg attatgctat gcactgggtg 180
aagcagagtc atgcaaagag tctagagtgg attggagtta ttagtactta ctatggtaat 240
acaaactaca accagaagtt taagggcaag gccacaatga ctgtagacaa atcctccagc 300
acagcctata tggaaacttg cagattgaca tctgaggatt ctgccatcta ttactgtgca 360
agaggaggat tacgagagta ttactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 420
accgtctcct caggtaagaa tggcctctca agctt 455

15 <210> 27
 <211> 434
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ADN recombinante
 <400> 27

gctagcacca ccatggaatc acagaccag gtccctcatgt ttcttctgct ctgggtatct 60
ggtgcctgtg cagacattgt gatgacacag tctccatcct ccctggctat gtcagtagga 120
cagaagggtca ctatgagctg caagtccagt cagagccttt taaatagtag caatcaaaag 180
aactatattg cctggtacca gcagaaacca ggacagtctc ctaaacttct ggtatacttt 240
gcattccacta ggaatctggt ggtccctgat cgcttcatag gcagtggatc tgggacagat 300
ttcaactctta ccatcagcag tgtgcaggct gaagacctgg cagattactt ctgtcagcaa 360
cattatagca ctctcccac gttcgggtgct gggaccaagc tggagctgaa acgtaagtac 420
acttttctga attc 434

25 <210> 28
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

ES 2 665 341 T3

<400> 28

cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc agc tat	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg	144
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
gga tgg atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc	192
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu	
50 55 60	
cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc aca gcc tac	240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aga tat att gcc tat gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca	336
Ala Arg Tyr Ile Ala Tyr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
atg gtc acc gtc tct tca	354
Met Val Thr Val Ser Ser	
115	

5

<210> 29
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 29

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

ES 2 665 341 T3

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Ile Ala Tyr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 30
- <211> 345
- 5 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (1)..(345)

- <400> 30

ES 2 665 341 T3

gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly 1 5 10 15	48
gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser 20 25 30	96
tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln 35 40 45	144
cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val 50 55 60	192
cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr 65 70 75 80	240
atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln 85 90 95	288
tat tat agt act cct tcg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag Tyr Tyr Ser Thr Pro Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu 100 105 110	336
atc aaa cga Ile Lys Arg 115	345

5

<210> 31
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 31

ES 2 665 341 T3

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 100 105 110

Ile Lys Arg
 115

5 <210> 32
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)

15 <400> 32

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

48

ES 2 665 341 T3

gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag 96
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg 192
 Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac 240
 Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aca tcc acc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca 420
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 33
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

<400> 33

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

ES 2 665 341 T3

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 34
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADN recombinante

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

15

<400> 34

caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc act gat tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg gag tgg att 144
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac cag aag ttt 192
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aca tcc acc agc aca gcc tat 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac tac tgg ggt 336
 Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 121
 <212> PRT

20

ES 2 665 341 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

5

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 36

<211> 456

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> ADN recombinante

<400> 36

ES 2 665 341 T3

actagtacca ccatgggttg gagctgtatc atcttctttc tggtagcaac agctacaggg 60
 gtgcactccc aagtccagct ggtgcagtct ggggctgaag tgaagaagcc tggggcctca 120
 gtgaaagtct cctgcaaggg ttccggctac acattcactg attatgctat gcaactgggtg 180
 cgacaggccc ctggacaagg cctggagtgg attggagtta ttagtactta ctatggtaat 240
 aaaaactaca accagaagtt taagggcaag gccacaatga ctgtcgacac atccaccagc 300
 acagcctata tggaaacttag gagcttgaga tctgacgata ctgccgtgta ttactgtgca 360
 agaggaggat tgcgagagta ttactatgct atggactact ggggtcaagg aaccatggtc 420
 accgtctcct caggtaagat gggctttcct aagctt 456

<210> 37
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADN recombinante

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)

15

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc 48
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag 96
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg 192
 Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac 240
 Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 cag aag ttt aag ggc cga gcc aca atg act gtc gac aca tcc acc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125
 tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca 420
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

ES 2 665 341 T3

<210> 38
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 39
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> ADN recombinante

20

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

25

<400> 39

ES 2 665 341 T3

caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag cct ggg gcc	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc act gat tat	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg gag tgg att	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac cag aag ttt	192
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc cga gcc aca atg act gtc gac aca tcc acc agc aca gcc tat	240
Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac tac tgg ggt	336
Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly	
100 105 110	
caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca	363
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

- 5 <210> 40
- <211> 121
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Construcción sintética (proteína recombinante)
- <400> 40

ES 2 665 341 T3

<220>
<223> ADN recombinante

5 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(399)

<400> 42

atg gaa tca cag acc cag gtc ctc atg ttt ctt ctg ctc tgg gta tct	48
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser	
1 5 10 15	
ggt gcc tgt gca gac att gtc atg aca cag tct cca gac tcc ctg gct	96
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala	
20 25 30	
gtg tca ctg gga gag agg gcc act atc aac tgc aag tcc agt cag agc	144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctt ctg aat agt agc aat caa aag aac tat ttg gcc tgg tac cag cag	192
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln	
50 55 60	
aaa cca gga cag cct cct aaa ctt ctg gtc tac ttt gca tcc act agg	240
Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg	
65 70 75 80	
gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat	288
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	
85 90 95	
ttc act ctt acc atc agc agt ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tac	336
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr	
100 105 110	
tac tgt cag caa cat tat agc act cct ccc aca ttc ggt cag ggg acc	384
Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr	
115 120 125	
aag ctg gag atc aaa	399
Lys Leu Glu Ile Lys	
130	

10

<210> 43
<211> 133
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

20

<400> 43

ES 2 665 341 T3

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

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

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys
130

5 <210> 44
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

15 <400> 44

ES 2 665 341 T3

```

gac att gtc atg aca cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tca ctg gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15

gag agg gcc act atc aac tgc aag tcc agt cag agc ctt ctg aat agt      96
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
           20           25           30

agc aat caa aag aac tat ttg gcc tgg tac cag cag aaa cca gga cag      144
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
           35           40           45

cct cct aaa ctt ctg gtc tac ttt gca tcc act agg gaa tct ggg gtc      192
Pro Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
           50           55           60

cct gat cgc ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctt acc      240
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

atc agc agt ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tac tac tgt cag caa      288
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
           85           90           95

cat tat agc act cct ccc aca ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc      336
His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
           100           105           110

aaa      339
Lys

```

5 <210> 45
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 45

```

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

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

```

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

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

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

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

His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

5 <210> 46
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<400> 46

gctagcacca ccatggaatc acagaccag gtccatcatgt ttcttctgct ctgggtatct 60
ggtgccctgtg cagacattgt catgacacag tctccagact ccctggctgt gtcactggga 120
gagagggccca ctatcaactg caagtccagt cagagccttc tgaatagtag caatcaaaag 180
aactatattgg cctggtacca gcagaaacca ggacagcctc ctaaacttct ggtctacttt 240
gcatccacta ggaatctg ggtccctgat cgcttcagtg gcagtggatc tgggacagat 300
ttcactetta ccatcagcag tctgcagget gaagatgtgg cagtttacta ctgtcagcaa 360
cattatagca ctctcccac attcggtcag gggaccaagc tggagatcaa acgtaagtac 420
ttttttttcg aattc 435

15 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ADN sintético

<400> 47
 gaaccgtcag atcgctgga gacg 24

25 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 665 341 T3

```

<220>
<223> ADN sintético

<400> 48
5   tgaagatga gctggaggac      20

<210> 49
<211> 20
<212> ADN
10  <213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

15  <400> 49
    cttctgtc cacctggcg      20

<210> 50
<211> 19
20  <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

25  <400> 50
    gctgtctac agtctcag      19

<210> 51
<211> 18
30  <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

35  <400> 51
    acgtgccaaag catcctcg      18

<210> 52
<211> 1413
40  <212> ADN
    <213> Artificial

45  <220>
    <223> ADN recombinante

<220>
50  <221> CDS
    <222> (1)..(1413)

<400> 52

    atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggt      48

```

ES 2 665 341 T3

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Phe	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly		
1				5					10						15		
gtg	cac	tcc	cag	gtc	cag	ctg	cag	cag	tct	ggg	cct	gag	ctg	gtg	agg		96
Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Arg		
			20					25					30				
cct	ggg	gtc	tca	gtg	aag	att	tcc	tgc	aag	ggg	tcc	ggc	tac	aca	ttc		144
Pro	Gly	Val	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe		
		35					40					45					
act	gat	tat	gct	atg	cac	tgg	gtg	aag	cag	agt	cat	gca	aag	agt	cta		192
Thr	Asp	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Ala	Lys	Ser	Leu		
	50					55					60						
gag	tgg	att	gga	gtt	att	agt	act	tac	tat	ggg	aat	aca	aac	tac	aac		240
Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn		
65					70					75					80		
cag	aag	ttt	aag	ggc	aag	gcc	aca	atg	act	gta	gac	aaa	tcc	tcc	agc		288
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser		
			85						90					95			
aca	gcc	tat	atg	gaa	ctt	gcc	aga	ttg	aca	tct	gag	gat	tct	gcc	atc		336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ala	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Ile		
			100					105						110			
tat	tac	tgt	gca	aga	gga	gga	tta	cga	gag	tat	tac	tat	gct	atg	gac		384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp		
		115					120						125				
tac	tgg	ggg	caa	gga	acc	tca	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag		432
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
	130					135						140					
ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg		480
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
145				150						155					160		
ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg		528
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			165						170					175			
gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc		576
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		
			180					185					190				
ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg		624
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val		
		195					200						205				
gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac		672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn		
	210					215						220					
gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	gtt	gag	ccc		720
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro		
225				230						235				240			
aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa		768
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu		
			245						250					255			

ES 2 665 341 T3

ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	816
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
			260					265					270			
acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	864
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
		275					280					285				
gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	912
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
	290					295					300					
gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	960
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
305					310					315					320	
agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	1008
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
				325					330					335		
ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	1056
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	
			340					345					350			
gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	1104
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
		355					360					365				
cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	1152
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	
	370					375					380					
cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	1200
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
385					390					395					400	
gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	1248
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
				405				410						415		
acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	1296
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
			420					425					430			
ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	1344
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
		435					440					445				
tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	1392
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	
	450					455					460					
tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	tga										1413
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
465					470											

<210> 53
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

ES 2 665 341 T3

<400> 53

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 665 341 T3

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 54
 <211> 723

<212> ADN
<213> Artificial

5
<220>
<223> ADN recombinante

10
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(723)
<400> 54

ES 2 665 341 T3

atg gaa tca cag acc cag gtc ctc atg ttt ctt ctg ctc tgg gta tct	48
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser	
1 5 10 15	
ggt gcc tgt gca gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc ctg gct	96
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala	
20 25 30	
atg tca gta gga cag aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agc	144
Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctt tta aat agt agc aat caa aag aac tat ttg gcc tgg tac cag cag	192
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln	
50 55 60	
aaa cca gga cag tct cct aaa ctt ctg gta tac ttt gca tcc act agg	240
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg	
65 70 75 80	
gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc ata ggc agt gga tct ggg aca gat	288
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	
85 90 95	
ttc act ctt acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gat tac	336
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr	
100 105 110	
ttc tgt cag caa cat tat agc act cct ccc acg ttc ggt gct ggg acc	384
Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr	
115 120 125	
aag ctg gag ctg aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc	432
Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe	
130 135 140	
ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc	480
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys	
145 150 155 160	
ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg	528
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val	
165 170 175	
gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag	576
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln	
180 185 190	
gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc	624
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser	
195 200 205	
aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat	672
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His	
210 215 220	
cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt	720
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
225 230 235 240	
tag	723

<210> 55
<211> 240

ES 2 665 341 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 55

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

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

Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

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

Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125

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

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

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

165

170

175

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

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

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 56
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADN recombinante

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

15

<400> 56

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg	192
Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aca tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	

ES 2 665 341 T3

115					120					125						
tac	tgg	ggt	caa	gga	acc	atg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag	432
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	
	130						135					140				
ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	480
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	
145						150					155				160	
ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	528
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
				165					170					175		
gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	576
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
			180					185					190			
ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	624
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
		195						200					205			
gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn		
	210						215					220				
gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	ggt	gag	ccc	720
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	
225					230					235					240	
aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	768
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	
			245						250					255		
ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	816
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
			260					265						270		
acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	864
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
		275					280						285			
gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	912
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
	290					295					300					
gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	960
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
305					310					315					320	
agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	1008
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
			325						330					335		
ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	1056
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	
			340					345					350			
gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	1104
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
		355					360					365				
cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	1152

ES 2 665 341 T3

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

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc 1200
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc 1248
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag 1296
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc 1344
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc 1392
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1413
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 57
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 57

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

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

ES 2 665 341 T3

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

ES 2 665 341 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 58
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADN recombinante

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

15

<400> 58

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc 48
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag 96
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg 192
 Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac 240

ES 2 665 341 T3

Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn		
65					70					75					80		
cag	aag	ttt	aag	ggc	cga	gcc	aca	atg	act	gtc	gac	aca	tcc	acc	agc		288
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser		
				85					90					95			
aca	gcc	tat	atg	gaa	ctt	agg	agc	ttg	aga	tct	gac	gat	act	gcc	gtg		336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val		
			100					105						110			
tat	tac	tgt	gca	aga	gga	gga	ttg	cga	gag	tat	tac	tat	gct	atg	gac		384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp		
		115					120						125				
tac	tgg	ggt	caa	gga	acc	atg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag		432
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
	130					135						140					
ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg		480
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
145					150					155					160		
ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg		528
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
				165					170					175			
gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc		576
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		
			180					185					190				
ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg		624
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val		
		195					200						205				
gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac		672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn		
		210				215						220					
gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	ggt	gag	ccc		720
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro		
225					230					235				240			
aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa		768
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu		
				245					250					255			
ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac		816
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
			260					265						270			
acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	oct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac		864
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp		
		275					280						285				
gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc		912
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		
		290				295					300						
gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac		960
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn		
305					310						315				320		

ES 2 665 341 T3

agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg 1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca 1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa 1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac 1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
370 375 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc 1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc 1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag 1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc 1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc 1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1413
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 59
<211> 470
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

<400> 59

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

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

ES 2 665 341 T3

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

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

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

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

ES 2 665 341 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

5 <210> 60
<211> 723
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(723)

15 <400> 60

atg gaa tca cag acc cag gtc ctc atg ttt ctt ctg ctc tgg gta tct
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

48

ES 2 665 341 T3

ggt gcc tgt gca gac att gtc atg aca cag tct cca gac tcc ctg gct Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala 20 25 30	96
gtg tca ctg gga gag agg gcc act atc aac tgc aag tcc agt cag agc Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser 35 40 45	144
ctt ctg aat agt agc aat caa aag aac tat ttg gcc tgg tac cag cag Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln 50 55 60	192
aaa cca gga cag cct cct aaa ctt ctg gtc tac ttt gca tcc act agg Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg 65 70 75 80	240
gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp 85 90 95	288
ttc act ctt acc atc agc agt ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tac Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr 100 105 110	336
tac tgt cag caa cat tat agc act cct ccc aca ttc ggt cag ggg acc Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr 115 120 125	384
aag ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe 130 135 140	432
ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys 145 150 155 160	480
ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val 165 170 175	528
gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln 180 185 190	576
gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser 195 200 205	624
aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His 210 215 220	672
cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230 235 240	720
tag	723

<210> 61
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

ES 2 665 341 T3

<210> 62
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADN recombinante

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 62

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg	192
Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	
115 120 125	
tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag	432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys	
130 135 140	
ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg	480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly	
145 150 155 160	
ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg	528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro	
165 170 175	
gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc	576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr	

15

ES 2 665 341 T3

180					185					190						
ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	624
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
		195						200						205		
gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	
		210					215							220		
gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	gtt	gag	ccc	720
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	
						230									240	
aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	768
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	
						245									255	
ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	816
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
			260												270	
acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	864
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
			275												285	
gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	912
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
			290												300	
gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	960
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
															320	
agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	1008
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
						325									335	
ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	1056
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	
															350	
gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	1104
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
															365	
cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	1152
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	
															380	
cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	1200
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
															400	
gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	1248
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
															415	
acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	1296
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
															420	
ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	1344

ES 2 665 341 T3

```

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

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc      1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
      450                               455                               460

tcc ctg tct ccg ggt aaa tga
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                               470

```

- <210> 63
- <211> 470
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

- <400> 63

ES 2 665 341 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

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

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

ES 2 665 341 T3

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

- 5 <210> 64
- <211> 1413
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> ADN recombinante
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1413)
- 15 <400> 64

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg	192
Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	
115 120 125	
tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag	432

ES 2 665 341 T3

Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	
	130					135						140				
ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	480
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	
145					150					155					160	
ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	528
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
				165					170					175		
gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	576
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
			180					185					190			
ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	624
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
		195					200					205				
gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	
	210					215					220					
gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	gtt	gag	ccc	720
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	
225					230					235					240	
aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	768
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	
				245					250					255		
ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	816
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
			260					265					270			
acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	864
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
		275					280					285				
gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	912
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
	290					295					300					
gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	960
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
305					310					315					320	
agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	1008
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
				325					330					335		
ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	1056
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	
			340					345					350			
gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	1104
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
		355					360					365				
cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	1152
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	
	370					375					380					

ES 2 665 341 T3

```

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc      1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                      390                      395                      400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc      1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                      405                      410                      415

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag      1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                      420                      425                      430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc      1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
                      435                      440                      445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc      1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
                      450                      455                      460

tcc ctg tct ccg ggt aaa tga      1413
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                      470

```

<210> 65
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 65

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1                      5                      10                      15

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

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

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50                      55                      60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
                85                      90                      95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
                100                      105                      110

```

ES 2 665 341 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 665 341 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

5 <210> 66
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)

15 <400> 66

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
act gat tat gct atg cac tgg gtg oga cag gcc cct gga caa ggc ctg	192
Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	

ES 2 665 341 T3

```

cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aca tcc acc agc      288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
                    85                      90                      95

aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
                    100                     105                     110

tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
                    115                      120                      125

tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca      420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
                    130                      135                      140

```

<210> 67

<211> 140

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 67

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1                    5                      10                      15

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

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

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50                    55                      60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
                85                      90                      95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
                100                     105                     110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
115                    120                      125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
130                    135                      140

```

15

<210> 68

<211> 363

ES 2 665 341 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> ADN recombinante

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)
 10 <400> 68

caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag cct ggg gcc	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aaa gtc tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg gag tgg att	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac cag aag ttt	192
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aca tcc acc agc aca gcc tat	240
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac tac tgg ggt	336
Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly	
100 105 110	
caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca	363
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

 <210> 69
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

 <400> 69

ES 2 665 341 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 70
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)

15 <400> 70

ES 2 665 341 T3

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg	192
Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	
115 120 125	
tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca	420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

<210> 71
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

<400> 71

ES 2 665 341 T3

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

5 <210> 72
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

15 <400> 72

ES 2 665 341 T3

caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc act gat tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

 gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg gag tgg att 144
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac cag aag ttt 192
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc aca gcc tat 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac tac tgg ggt 336
 Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

 caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 73
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

<400> 73

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

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

 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

ES 2 665 341 T3

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

5 <210> 74
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)

15 <400> 74

ES 2 665 341 T3

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg	192
Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	
115 120 125	
tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca	420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

<210> 75
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

<400> 75

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

5 <210> 76
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

15 <400> 76

ES 2 665 341 T3

```

caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag cct ggg gcc      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

tca gtg aaa gtc tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat      96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
          20          25          30

gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg gag tgg att      144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac cag aag ttt      192
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
          50          55          60

aag ggc aag gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc aca gcc tat      240
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg tat tac tgt      288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac tac tgg ggt      336
Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110

caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca      363
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 77
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 77

```

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

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

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

```

ES 2 665 341 T3

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 78
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)

15 <400> 78

ES 2 665 341 T3

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg	192
Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttt aag ggc cga gcc aca atg act gtc gac aca tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	
115 120 125	
tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca	420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

<210> 79
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

<400> 79

ES 2 665 341 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

- 5 <210> 80
- <211> 363
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> ADN recombinante
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(363)
- 15 <400> 80

ES 2 665 341 T3

```

caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag cct ggg gcc      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15

tca gtg aaa gtc tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat      96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
          20           25           30

gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg gag tgg att      144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45

gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac cag aag ttt      192
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
          50           55           60

aag ggc cga gcc aca atg act gtc gac aca tcc acc agc aca gcc tat      240
Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
          65           70           75           80

atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg tat tac tgt      288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac tac tgg ggt      336
Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
          100           105           110

caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca      363
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115           120

```

5 <210> 81
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 81

```

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

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

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

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

```

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 82
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)

<400> 82

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg	192
Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttt aag ggc cga gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	
115 120 125	
tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca	420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

ES 2 665 341 T3

<210> 83
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)
 10
 <400> 83

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

15 <210> 84
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN recombinante
 20
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)
 25 <400> 84

ES 2 665 341 T3

caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag cct ggg gcc	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aaa gtc tcc tgc aag gct tcc ggc tac aca ttc act gat tat	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg gag tgg att	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac cag aag ttt	192
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc cga gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc aca gcc tat	240
Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac tac tgg ggt	336
Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly	
100 105 110	
caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca	363
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

<210> 85
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

<400> 85

ES 2 665 341 T3

atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ctg gta gca aca gct aca ggc	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtg cac tcc caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aaa gtc tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
act gat tat gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg	192
Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttt aag ggc cga gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tat atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp	
115 120 125	
tac tgg ggt caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca	420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

<210> 87
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

<400> 87

ES 2 665 341 T3

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15

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

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

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50          55          60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
85          90          95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100         105         110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
115         120         125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
130         135         140

```

5 <210> 88
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN recombinante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

15 <400> 88

caa gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag cct ggg gcc

48

ES 2 665 341 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1	5 10 15
tca gtg aaa gtc tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
	20 25 30
gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctg gag tgg att	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
	35 40 45
gga gtt att agt act tac tat ggt aat aca aac tac aac cag aag ttt	192
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
	50 55 60
aag ggc cga gcc aca atg act gtc gac aaa tcc acc agc aca gcc tat	240
Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80
atg gaa ctt agg agc ttg aga tct gac gat act gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95
gca aga gga gga ttg cga gag tat tac tat gct atg gac tac tgg ggt	336
Ala Arg Gly Gly Leu Arg Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly	
	100 105 110
caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca	363
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
	115 120

<210> 89
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

10

<400> 89

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo contra la Dlk-1 humana, en el que la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 35, 40, 69, 73, 77, 81, 85 y 89, y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45.
- 10 2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual:
 (a) tiene una actividad antitumoral *in vivo*; y/o
 (b) se une a al menos una porción de una región que comprende aminoácidos en las posiciones 24 a 91 en la secuencia de aminoácidos de la Dlk-1 humana que se muestra en la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo monoclonal.
- 20 4. Un complejo, que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un compuesto que tiene una actividad antitumoral y/o una actividad destructora de células.
- 25 5. Una composición farmacéutica, que comprende al menos uno del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y el complejo de acuerdo con la reivindicación 6.
6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el complejo de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de un tumor.
- 30 7. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el complejo de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en un método de inducción de apoptosis en células tumorales.
- 35 8. El anticuerpo, composición o complejo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que el tumor es al menos uno de cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de páncreas humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neuroblastoma humano.
- 40 9. Un agente terapéutico antitumoral, que comprende al menos uno del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y el complejo de acuerdo con la reivindicación 4.
- 45 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 5 o el agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 9, que no causa reducción de peso como efecto secundario.
- 50 11. Un agente adecuado para inducir apoptosis en células tumorales, que comprende al menos uno del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y el complejo de acuerdo con la reivindicación 4.
- 55 12. Un kit adecuado para tratar, diagnosticar o detectar un tumor o para inducir apoptosis en células tumorales, que comprende al menos uno del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y el complejo de acuerdo con la reivindicación 4.
- 60 13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, el complejo de acuerdo con la reivindicación 4, la composición de acuerdo con la reivindicación 10, el agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, el agente inductor de apoptosis de la reivindicación 11 o el kit de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el tumor es al menos uno de cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de páncreas humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neuroblastoma humano.
14. Un método para detectar un tumor, que comprende: permitir que al menos uno del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y el complejo de acuerdo con la reivindicación 4, reaccione con una muestra recogida de un cuerpo vivo; y detectar una señal o señales del anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo reaccionado.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el tumor es al menos uno de cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de páncreas humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neuroblastoma humano.

Fig. 1

ATGGGTTGGAGCTGTATCATCTTCTTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTGCACTCCCAG
M G W S C I I F F L V A T A T G V H S Q

GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATTTC
V Q L Q Q S G P E L V R P G V S V K I S

TGCAAGGGTTCCGGCTACACATTCAGTATTATGCTATGCACTGGGTGAAGCAGAGTCAT
C K G S G Y T F T D Y A M H W V K Q S H

GCAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACTATGGTAATACAAACTACAAC
A K S L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N

CAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTATATG
Q K F K G K A T M T V D K S S S T A Y M

GAAGTTGCCAGATTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGGAGGATTA
E L A R L T S E D S A I Y Y C A R G G L

CGAGAGTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
R E Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S

Fig. 2

ATGGAATCACAGACCCAGGTCCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCTGGTGCCTGTGCA
M E S Q T Q V L M F L L L W V S G A C A

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGTCAGTAGGACAGAAGGTCACT
D I V M T Q S P S S L A M S V G Q K V T

ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAGCAATCAAAGAACTATTTGGCC
M S C K S S Q S L L N S S N Q K N Y L A

TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCATCCACTAGG
W Y Q Q K P G Q S P K L L V Y E A S T R

GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTTACC
E S G V P D R F I G S G S G T D F T L T

ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTTCAGCAACATTATAGCACT
I S S V Q A E D L A D Y F C Q Q H Y S T

CCTCCCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
P P T F G A G T K L E L K

Fig. 3

SpeI

ACTAGTACCACCATGGGTTGGAGCTGTATCATCTTCTTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGT
M G W S C I I F F L V A T A T G

GTGCACTCCCAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCA
V H S Q V Q L Q Q S G P E L V R P G V S

GTGAAGATTTCTGCAAGGGTCCGGCTACACATTCACTGATTATGCTATGCACCTGGGTG
V K I S C K G S G Y T F T D Y A M H W V

AAGCAGAGTCATGCAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACTATGGTAAT
K Q S H A K S L E W I G V I S T Y Y G N

ACAAACTACAACCAGAAGTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
T N Y N Q K F K G K A T M T V D K S S S

ACAGCCTATATGGAACCTGCCAGATGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCA
T A Y M E L A R L T S E D S A I Y Y C A

AGAGGAGGATTACGAGAGTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC
R G G L R E Y Y Y A M D Y W G Q G T S V

HindIII

ACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCAAGCTT
T V S S

Fig. 4

NheI

GCTAGCACCACCATGGAATCACAGACCCAGGTCCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCT
M E S Q T Q V L M F L L L W V S

GGTGCTGTGCAGACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGTCAGTAGGA
G A C A D I V M T Q S P S S L A M S V G

CAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAGCAATCAAAG
Q K V T M S C K S S Q S L L N S S N Q K

AACTATTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTT
N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L V Y F

GCATCCACTAGGGAATCTGGCGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
A S T R E S G V P D R F I G S G S G T D

TTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTTCAGCAA
F T L T I S S V Q A E D L A D Y F C Q Q

CATTATAGCACTCCTCCCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTAAGTAC
H Y S T P P T F G A G T K L E L K

EcoRI

ACTTTTCTGAATTC

Fig. 5

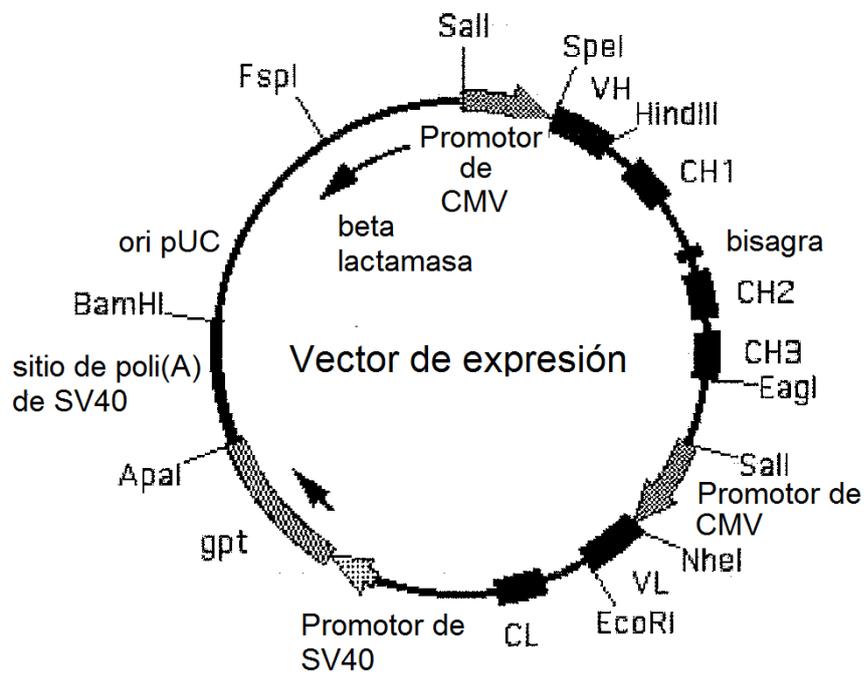


Fig. 6

		1	2	3	
		123456789	0123456789	0123456789	0123456789
BA-1-3D VH		QVQLQQSGP	ELVRPGVSVK	ISCKGSGYTF	<u>TDYAMHWVKQ</u>
HuBA-1-3D VH1		QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	<u>TDYAMHWVRQ</u>
HuBA-1-3D VH2		QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	<u>TDYAMHWVRQ</u>
U00503 VH		QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ
		4	5	6	7
		0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
			a		
BA-1-3D VH		SHAKSLEWIG	<u>VISTYYGNTNY</u>	<u>NQKFKGKATM</u>	<u>TVDKSSSTAY</u>
HuBA-1-3D VH1		APGQGLEWIG	<u>VISTYYGNTNY</u>	<u>NQKFKGKATM</u>	<u>TVDTSTSTAY</u>
HuBA-1-3D VH2		APGQGLEWIG	<u>VISTYYGNTNY</u>	<u>NQKFKGRATM</u>	<u>TVDTSTSTAY</u>
U00503 VH		APGQGLEWIG	-----	-----RVTM	<u>TTDTSTSTAY</u>
		8	9	1	1
		0122223456789	0123456789	00000123456789	0123
		abc		abcd	
BA-1-3D VH		MELARLTSEDSAI	<u>YYCARGGLRE</u>	<u>YYYAMDYWGQTSV</u>	TVSS
HuBA-1-3D VH1		MELRSLRSDDTAV	<u>YYCARGGLRE</u>	<u>YYYAMDYWGQTMV</u>	TVSS
HuBA-1-3D VH2		MELRSLRSDDTAV	<u>YYCARGGLRE</u>	<u>YYYAMDYWGQTMV</u>	TVSS
U00503 VH		MELRSLRSDDTAV	YYCAR-----	-----WGQTMV	TVSS

Fig. 7

		1		2		3		
	123456789	0123456789	0123456777777789	0123456789				
			abcdef					
BA-1-3D VL	DIVMTQSPS	SLAMSVGQKV	<u>TMSCKSSQSLN</u> SSNQ	<u>KNYLAWYQQK</u>				
HuBA-1-3D VL	DIVMTQSPD	SLAVSLGERA	<u>TINCKSSQSLN</u> SSNQ	<u>KNYLAWYQQK</u>				
Z46622 VL	DIVMTQSPD	SLAVSLGERA	TINC-----	-----WYQQK				
		4		5		6		7
	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789		
BA-1-3D VL	PGQSPKLLVY	<u>FASTRESGVP</u>	<u>DRFIGSGSGT</u>	<u>DFTLTISSVQ</u>				
HuBA-1-3D VL	PGQPPKLLVY	<u>FASTRESGVP</u>	<u>DRFSGSGSGT</u>	<u>DFTLTISSLQ</u>				
Z46622 VL	PGQPPKLLIY	-----GVP	<u>DRFSGSGSGT</u>	<u>DFTLTISSLQ</u>				
						1		
	8		9			0		
	0123456789	0123456789	01234567					
BA-1-3D VL	<u>AEDLADYFCQ</u>	<u>QHYSTPPTFG</u>	<u>AGTKLELK</u>					
HuBA-1-3D VL	<u>AEDVAVYYCQ</u>	<u>QHYSTPPTFG</u>	<u>QGTKLEIK</u>					
Z46622 VL	<u>AEDVAVYYC-</u>	-----FG	<u>QGTKLEIKR</u>					

Fig. 8

SpeI

ACTAGTACCACCATGGGTTGGAGCTGTATCATCTTCTTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGC
 M G W S C I I F F L V A T A T G

GTGCACTCCCAAGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
 V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S

GTGAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGCTACACATTCAGTATTATGCTATGCACCTGGGTG
 V K V S C K A S G Y T F T D Y A M H W V

CGACAGGCCCTGGACAAGGCCTGGACTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACTATGGTAAT
 R Q A P G Q G L E W I G V I S T Y Y G N

ACAAACTACAACCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTGACACATCCACCAGC
T N Y N Q K F K G K A T M T V D T S T S

ACAGCCTATATGGAACCTTAGGAGCTTGAGATCTGACGATACTGCCGTGTATTACTGTGCA
 T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A

AGAGGAGGATTGCGAGAGTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTC
 R G G L R E Y Y Y A M D Y W G Q G T M V

HindIII

ACCGTCTCCTCAGGTAAGATGGGCTTTCCTAAGCTT
 T V S S

Fig. 9

SpeI

ACTAGTACCACCATGGGTTGGAGCTGTATCATCTTCTTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGC
M G W S C I I F F L V A T A T G

GTGCACTCCCAAGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S

GTGAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGCTACACATTCAGTATTATGCTATGCACTGGGTG
V K V S C K A S G Y T F T D Y A M H W V

CGACAGGCCCTGGACAAGGCCTGGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACTATGGTAAT
R Q A P G Q G L E W I G V I S T Y Y G N

ACAAACTACAACCAGAAGTTTAAGGGCCGAGCCACAATGACTGTGACACATCCACCAGC
T N Y N Q K F K G R A T M T V D T S T S

ACAGCCTATATGGAACTTAGGAGCTTGAGATCTGACGATACTGCCGTGTATTACTGTGCA
T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A

AGAGGAGGATTGCCGAGAGTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTC
R G G L R E Y Y Y A M D Y W G Q G T M V

HindIII

ACCGTCTCCTCAGGTAAGATGGGCTTTCCTAAGCTT
T V S S

Fig. 10

NheI
GCTAGCACCACCATGGAATCACAGACCCAGGTCCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCT
M E S Q T Q V L M F L L L W V S
GGTGCCTGTGCAGACATTGTCATGACACAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCAC TGGGA
G A C A D I V M T Q S P D S L A V S L G
GAGAGGGCCACTATCAACTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTCTGAATAGTAGCAATCAAAG
E R A T I N C K S S Q S L L N S S N Q K
AACTATTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAACTTCTGGTCTACTTT
N Y L A W Y Q Q K P G Q P P K L L V Y F
GCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D
TTCACTCTTACCATCAGCAGTCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTACTACTGTCAGCAA
F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q
CATTATAGCACTCCTCCCACATTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTAAGTAC
H Y S T P P T F G Q G T K L E I K

EcoRI
TTTTTTTTCGAATTC

Fig. 11

CMV2	GAACCGTCAGATCGCCTGGAGACG
JNT026	TGAAAGATGAGCTGGAGGAC
JNT082	CTTTCTTGTCACCTTGGTG
JNT097	GCTGTCCTACAGTCCTCAG
JNT098	ACGTGCCAAGCATCCTCG

Fig. 12

1 ATGGGTTGGAGCTGTATCATCTTCTTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTGCACTCCCAG
 M G W S C I I F F L V A T A T G V H S Q
 61 GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATTTCC
 V Q L Q Q S G P E L V R P G V S V K I S
 121 TGCAAGGGTCCCGCTACACATTCAGTATTGCTATGCACCTGGGTGAAGCAGAGTCAT
 C K G S G Y T F T D Y A M H W V K Q S H
 181 GCAAAGAGCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACTATGGTAATACAACTACAAC
 A K S L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N
 241 CAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTATATG
 Q K F K G K A T M T V D K S S S T A Y M
 301 GAACTTGCCAGATTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGGAGGATTA
 E L A R L T S E D S A I Y Y C A R G G L
 361 CGAGAGTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCCTCA
 R E Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S
 421 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
 481 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTG
 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 541 TGGAACTCAGGGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCCCTCA
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 601 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 661 TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
 721 AAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCACCGTGAACCTGAACTGGGGGGGA
 K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
 781 CCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
 841 GAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGG
 E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
 901 TAGGTGGAGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAAC
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
 961 AGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
 S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 1021 GAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S
 1081 AAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAG
 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
 1141 CTGACCAAGAACCAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
 L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
 1201 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCGTG
 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 1261 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
 1321 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAG
 Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
 1381 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
 Q K S L S L S P G K •

Fig. 13

1 ATGGAATCACAGACCCAGGTCCCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCTGGTGCCTGTGCA
 M E S Q T Q V L M F L L L W V S G A C A
 61 GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCCTCCCTGGCTATGTCACTAGGACAGAAGGTCACT
 D I V M T Q S P S S L A M S V G Q K V T
 121 ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAGCAATCAAAGAAGTATTTGGCC
 M S C K S S Q S L L N S S N Q K N Y L A
 181 TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCATCCACTAGG
 W Y Q Q K P G Q S P K L L V Y F A S T R
 241 GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACC
 E S G V P D R F I G S G S G T D F T L T
 301 ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTGTCAGCAACATTATAGCACT
 I S S V Q A E D L A D Y F C Q Q H Y S T
 361 CCTCCACGTTCCGGTGC TGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT
 P P T F G A G T K L E L K R T V A A P S
 421 GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC
 V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C
 481 CTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGGAGGTGGATAACGCCCTC
 L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L
 541 CAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC
 Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S
 601 CTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC
 L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C
 661 GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
 E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
 721 TAG

•

Fig. 14

1 ATGGGTTGGAGCTGTATCATCTTCTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGCGTGCACCTCCCAA
 M G W S C I I F F L V A T A T G V H S Q
 61 GTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAAGTCTCC
 V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S
 121 TGCAAGGCTTCCGGCTACACATTCACCTGATTATGCTATGCACTGGGTGGACAGGCCCT
 C K A S G Y T F T D Y A M H W V R Q A P
 181 GGACAAGGCTGGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACTATGGTAATACAAACTACAAC
 G Q G L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N
 241 CAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTCGACACATCCACCAGCACAGCCTATATG
 Q K F K G K A T M T V D T S T S T A Y M
 301 GAACTTAGGAGCTTGAGATCTGACGATACTGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGGAGGATTG
 E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G G L
 361 CGAGAGTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTCTCCTCA
 R E Y Y Y A M D Y W G Q G T M V T V S S
 421 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
 481 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTG
 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 541 TGGAAGTACAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCA
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 601 GGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 661 TACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
 721 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCACACCTGAACTCCTGGGGGGA
 K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
 781 CCGTCACTTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
 841 GAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
 E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
 901 TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATATGCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
 961 AGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
 S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 1021 GAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S
 1081 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAG
 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
 1141 CTGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
 L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
 1201 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACAAGACCACGCTCCCGTG
 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 1261 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
 1321 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAG
 Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
 1381 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA
 Q K S L S L S P G K •

Fig. 15

1 ATGGGTTGGAGCTGTATCATCTTCTTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGCGTGCACTCCCAA
 M G W S C I I F F L V A T A T G V H S Q
 61 GTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGTCTCC
 V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S
 121 TGCAAGGCTTCCGGCTACACATTCAGTATTGCTATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTC
 C K A S G Y T F T D Y A M H W V R Q A P
 181 GGACAAGCCTGGAGTGGATTGGAGTTATTACTACTTACTATGGTAATACAACTACAAC
 G Q G L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N
 241 CAGAAGTTAAGGGCCGAGCCACAATGACTGTGACACATCCACCAGCACAGCCTATATG
 Q K F K G R A T M T V D T S T S T A Y M
 301 GAACCTAGGAGCTTGAGATCTGACGATACTGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGGAGGATTG
 E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G G L
 361 CGAGATATTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTCTCCTCA
 R E Y Y Y A M D Y W G Q G T M V T V S S
 421 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
 481 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTG
 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 541 TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCA
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 601 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 661 TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
 721 AAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
 K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
 781 CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
 841 GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGG
 E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
 901 TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAAC
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
 961 AGCACGTACCCTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
 S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 1021 GAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S
 1081 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAG
 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
 1141 CTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
 L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
 1201 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 1261 CTGGACTCCGACGECTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGACAAAGAGCAGGTGG
 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
 1321 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAG
 Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
 1381 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
 Q K S L S L S P G K *

Fig. 16

1 ATGGAATCACAGACCCAGGTCCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCTGGTGCCTGTGCA
 M E S Q T Q V L M F L L L W V S G A C A
 61 GACATTGTCATGACACAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCCTGGGAGAGAGGGCCACT
 D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T
 121 ATCAACTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTCTGAATAGTAGCAATCAAAAGAACTATTTGGCC
 I N C K S S Q S L L N S S N Q K N Y L A
 181 TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAACTTCTGGTCTACTTTGCATCCACTAGG
 W Y Q Q K P G Q P P K L L V Y F A S T R
 241 GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACC
 E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
 301 ATCAGCAGTCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTACTACTGTTCAGCAACATTATAGCACT
 I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q H Y S T
 361 CCTCCCACATTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT
 P P T F G Q G T K L E I K R T V A A P S
 421 GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGC
 V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C
 481 CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC
 L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L
 541 CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC
 Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S
 601 CTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGC
 L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C
 661 GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
 E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
 721 TAG
 .

Fig. 17

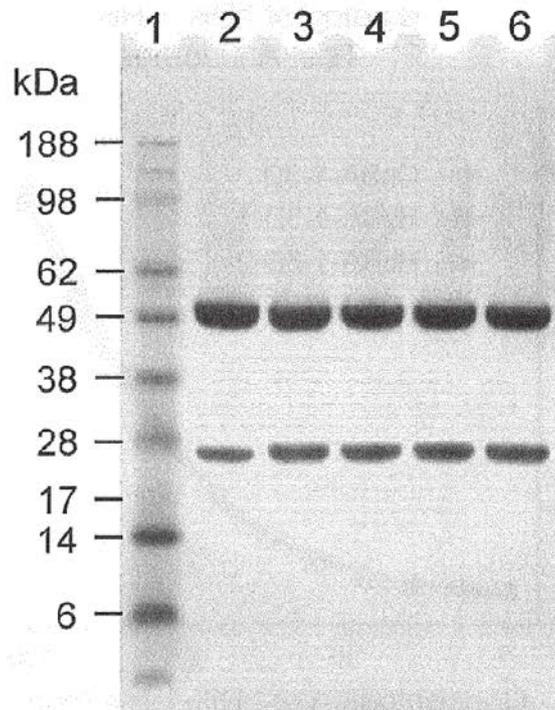


Fig. 18

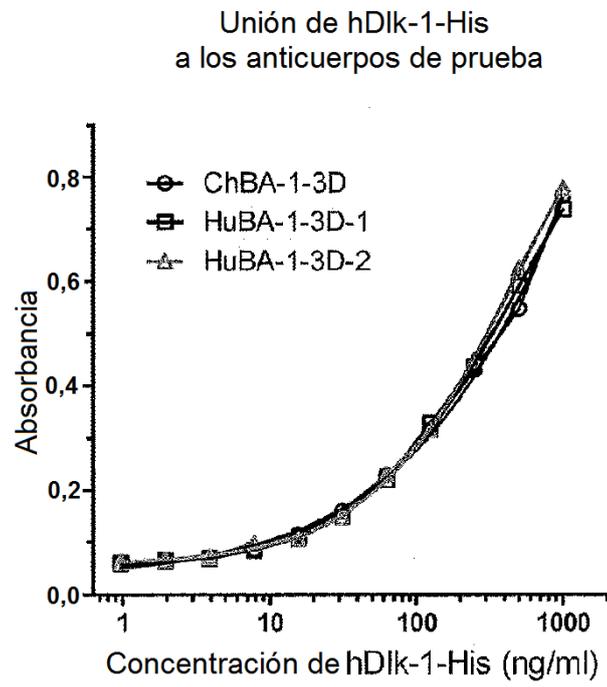


Fig. 19

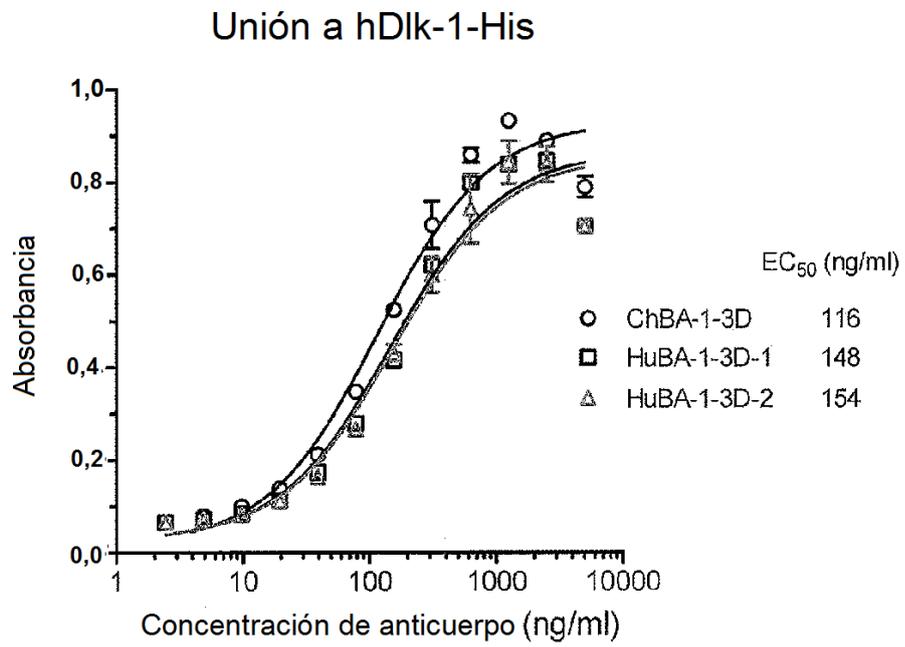


Fig. 20

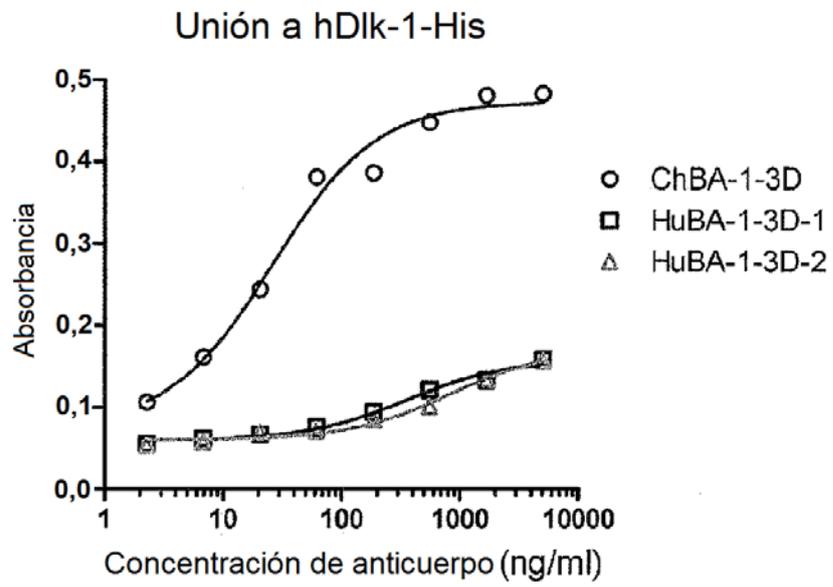


Fig. 21

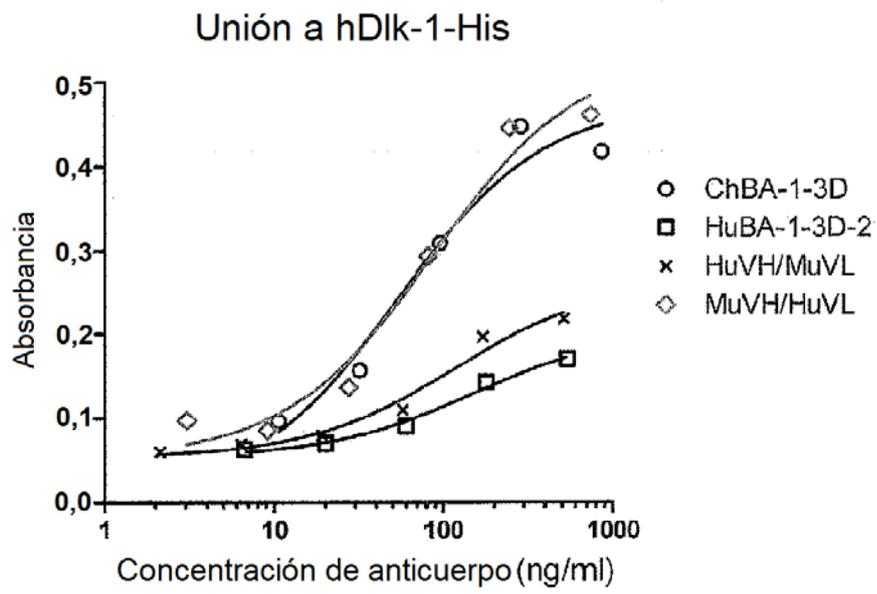


Fig. 22

	1	2	3	4	5
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789	01223456789
HuBA1-3D VH1	QVQLVQ8GA	EVKKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYAMHWVRQ	APGQGLEWIG VISTYYGNTNY
V5Q	---Q---	-----	-----	-----	-----
A9P	-----P	-----	-----	-----	-----
V11L	-----L	-----	-----	-----	-----
K12V	-----V	-----	-----	-----	-----
K13R	-----R	-----	-----	-----	-----
A16V	-----V	-----	-----	-----	-----
V20I	-----	I-----	-----	-----	-----
A24G	-----	---G---	-----	-----	-----
R38K	-----	-----	-----K-	-----	-----
A40S	-----	-----	-----	S-----	-----
P41H	-----	-----	-----	-H-----	-----
G42A	-----	-----	-----	A-----	-----
Q43K	-----	-----	-----	-K-----	-----
G44S	-----	-----	-----	---S---	-----
T73K	-----	-----	-----	-----	-----
T75S	-----	-----	-----	-----	-----
R82aA	-----	-----	-----	-----	-----
S82bR	-----	-----	-----	-----	-----
R83T	-----	-----	-----	-----	-----
D85E	-----	-----	-----	-----	-----
T87S	-----	-----	-----	-----	-----
V89I	-----	-----	-----	-----	-----
M108S	-----	-----	-----	-----	-----
V5Q/T73K	---Q---	-----	-----	-----	-----
V11L/T73K	-----L	-----	-----	-----	-----
A24G/T73K	-----	---G---	-----	-----	-----
T73K/T75S	-----	-----	-----	-----	-----

	6	7	8	9	10	11
	0123456789	0123456789	0122223456789	0123456789	00000123456789	0123
HuBA1-3D VH1	NQKFKGKATM	TVDISTSTAY	MELRSLRSDDTAV	YYCARGGLRE	YYYAMDYWGQGMV	TVSS
V5Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A9P	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V11L	-----	-----	-----	-----	-----	-----
K12V	-----	-----	-----	-----	-----	-----
K13R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A16V	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V20I	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A24G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R38K	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A40S	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P41H	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G42A	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Q43K	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G44S	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T73K	-----	-----K-	-----	-----	-----	-----
T75S	-----	-----S-	-----	-----	-----	-----
R82aA	-----	-----	---A---	-----	-----	-----
S82bR	-----	-----	---R---	-----	-----	-----
R83T	-----	-----	---T---	-----	-----	-----
D85E	-----	-----	---E---	-----	-----	-----
T87S	-----	-----	---S---	-----	-----	-----
V89I	-----	-----	---I---	-----	-----	-----
M108S	-----	-----	-----	-----	-----	-----S-
V5Q/T73K	-----	-----K-	-----	-----	-----	-----
V11L/T73K	-----	-----K-	-----	-----	-----	-----
A24G/T73K	-----	-----K-	-----	-----	-----	-----
T73K/T75S	-----	-----K-S-	-----	-----	-----	-----

Fig. 23

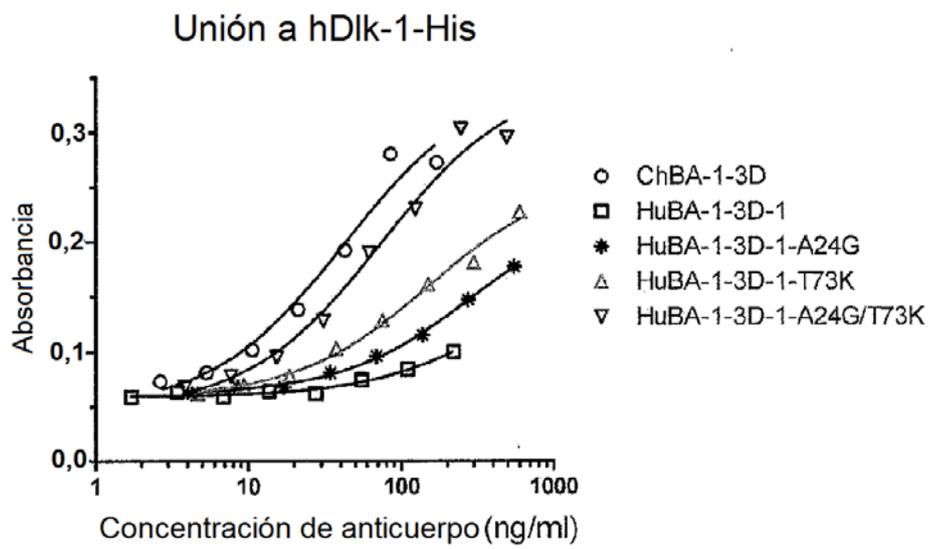


Fig. 24

```

1  ATGGGFTGGAGCTGTATCATCTTCTTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGCGTGCCTCCCAA
   M G W S C I I F F L V A T A T G V H S Q
61  GTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAAGTCTCC
   V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S
121 TGCAAGGCTTCCGGCTACACATTCAGTATTGCTATGCTACTGGGTGGGACAGGCCCCCT
   C K A S G Y T F T D Y A M H W V R Q A P
181 GGACAAGGCTGGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACTATGGTAATACAAACACAAC
   G Q G L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N
241 CAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTCGACAAATCCACCAGCACAGCCTATATG
   Q K F K G K A T M T V D K S T S T A Y M
301 GAACTTAGGAGCTTGAGATCTGACGATACTGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGGAGGATTG
   E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G G L
361 CGAGATATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTCTCCTCA
   R E Y Y Y A M D Y W G Q G T M V T V S S
421 GCCTCCACCAAGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
   A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
481 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCCG
   G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
541 TGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCCTCA
   W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
601 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
   G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
661 TACATCTGCAACGTGAATCACAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
   Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
721 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGA
   K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
781 CCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCAAAACCCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTP
   P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
841 GAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
   E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
901 TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
   Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
961 AGCACGTACCCTGTGGTCCAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
   S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
1021 GAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
   E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S
1081 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAG
   K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
1141 CTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATC
   L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
1201 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
   A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
1261 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGG
   L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
1321 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACAGC
   Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
1381 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
   Q K S L S L S P G K •

```

Fig. 25

1 ATGGGTTGGAGCTGTATCATCTTCTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGCGTGCCTCCCAA
 M G W S C I I F F L V A T A T G V H S Q
 61 GTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTAAAAGTCTCC
 V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S
 121 TGCAAGGGTCCGGCTACACATTCAGTATTATGCTATGCAGTGGGTGCGACAGGCCCCCT
 C K G S G Y T F T D Y A M H W V R Q A P
 181 GGACAAGCCTGGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACTATGGTAATACAACTACAAC
 G Q G L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N
 241 CAGAAGTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTCGACAAATCCACCAGCACAGCCTATATG
 Q K F K G K A T M T V D K S T S T A Y M
 301 GAACTTAGGAGCTTGAGATCTGACGATACTGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGGAGGATTG
 E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G G L
 361 CGAGAGTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTCTCCTCA
 R E Y Y Y A M D Y W G Q G T M V T V S S
 421 GCCTCCACCAAGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
 481 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCG
 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 541 TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGCCTCTCA
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 601 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCAGCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 661 TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGACAAGAAAGTTGAGCCC
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
 721 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
 K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
 781 CCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCCGACCCCT
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
 841 GAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
 E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
 901 TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
 961 AGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAGCGTCCCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
 S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 1021 GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S
 1081 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
 1141 CTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
 L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
 1201 GCCGTGGACTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 1261 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
 1321 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAG
 Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
 1381 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
 Q K S L S L S P G K •

Fig. 26

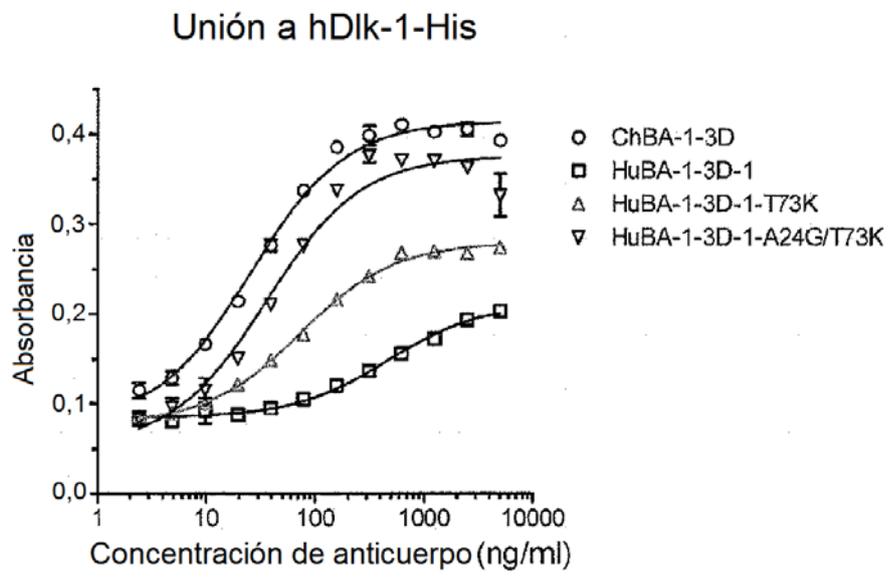


Fig. 27

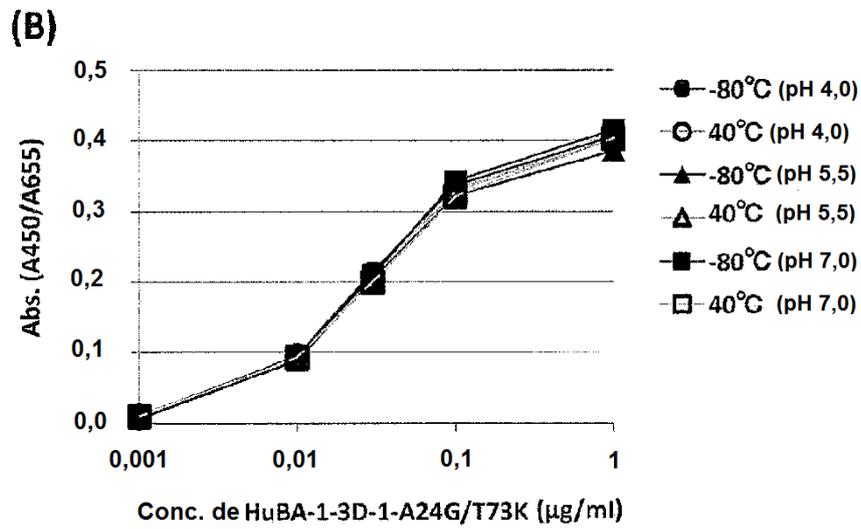
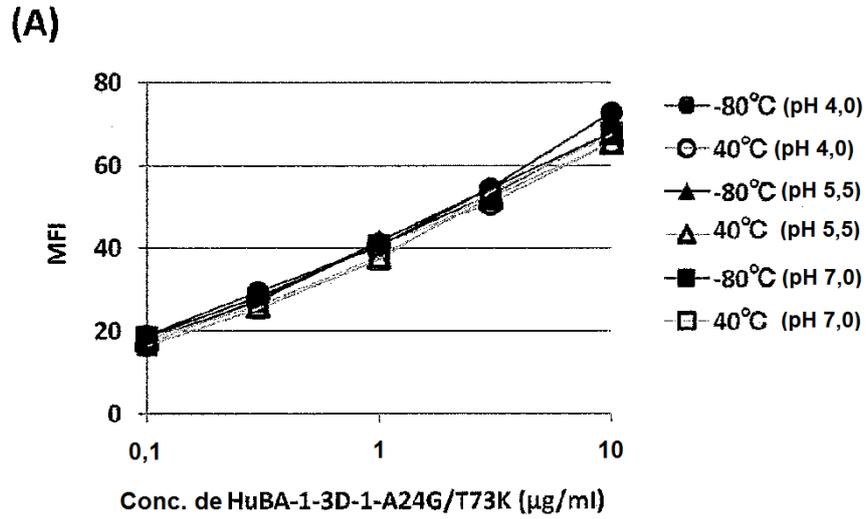


Fig. 28

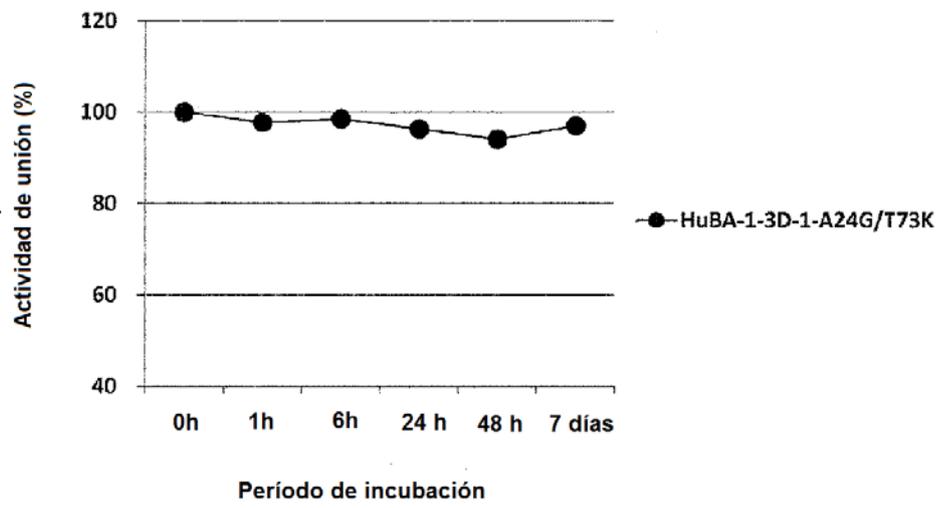
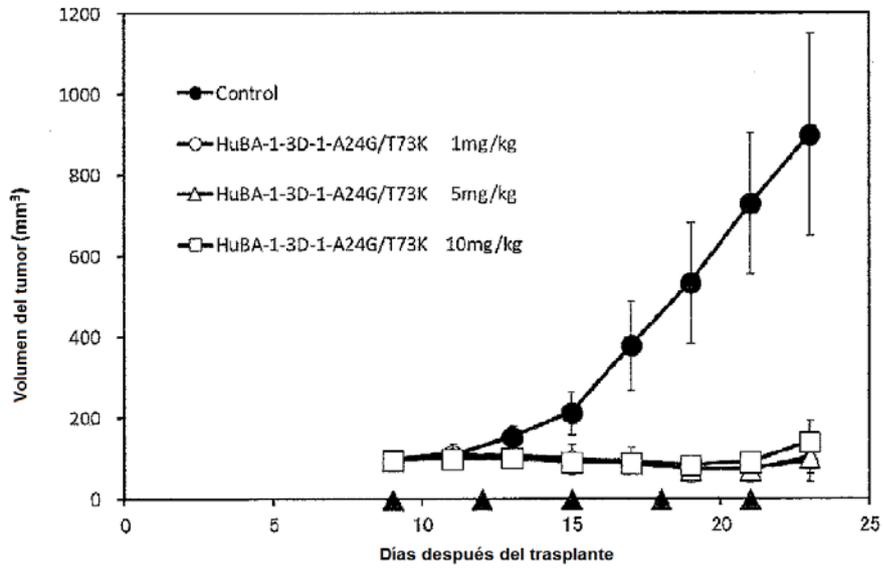


Fig. 29

A



B

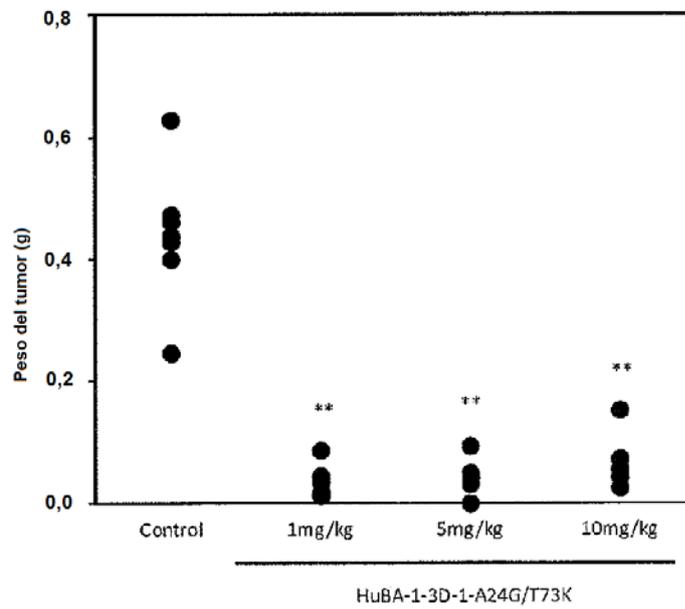
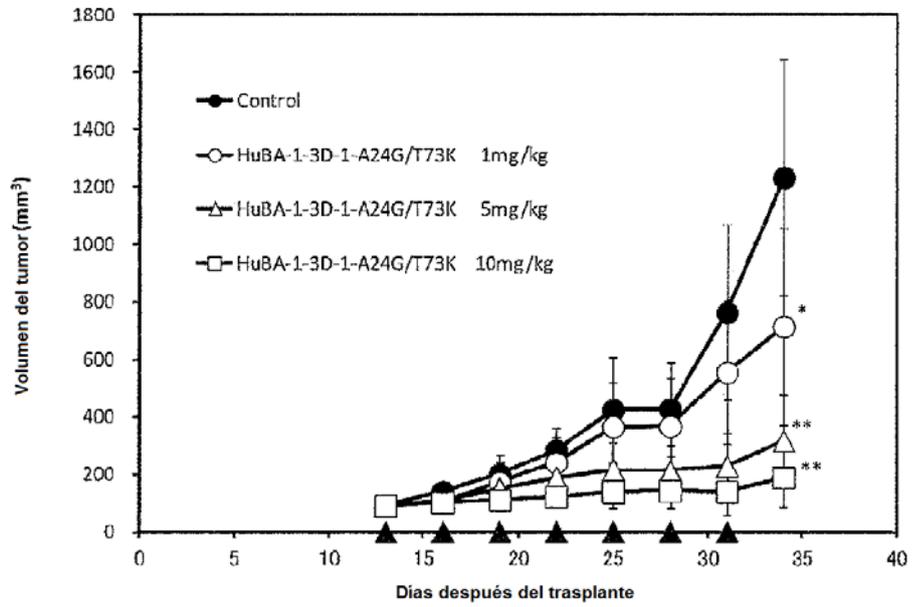


Fig. 30

A



B

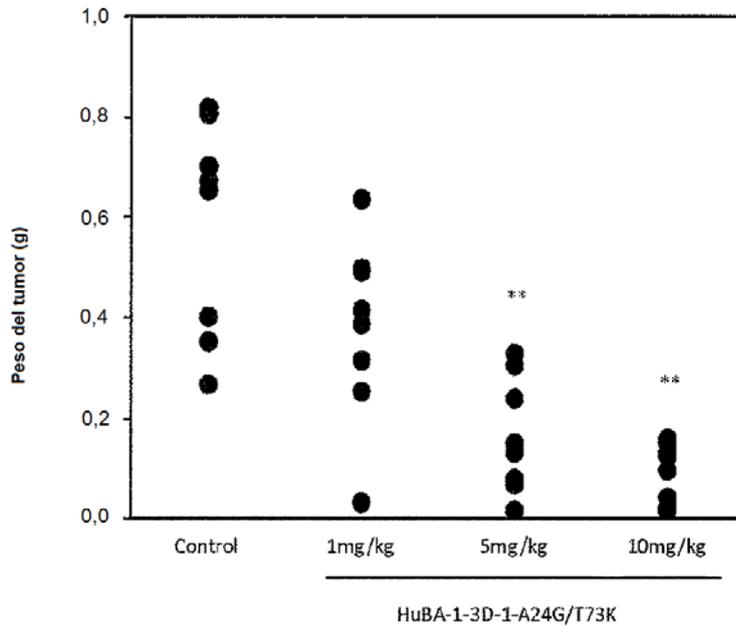


Fig. 31

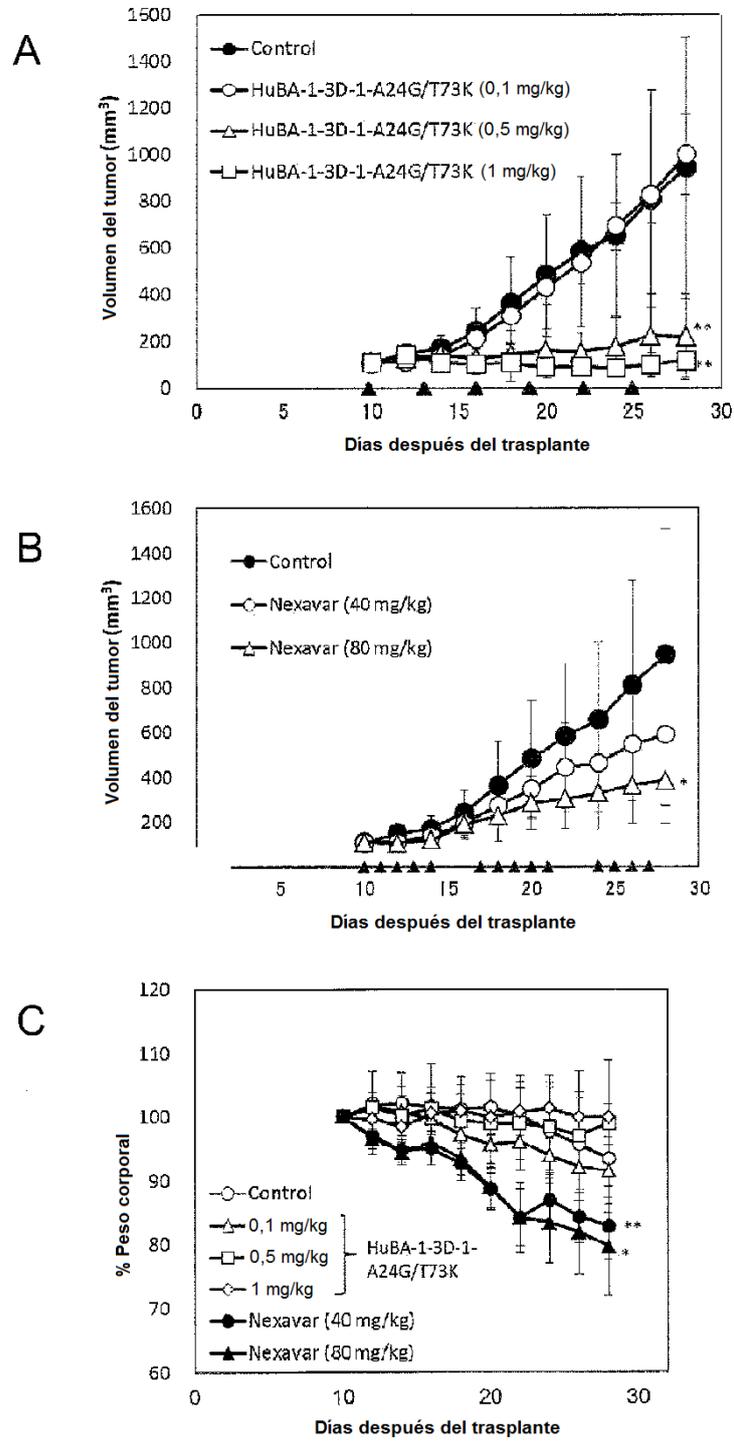
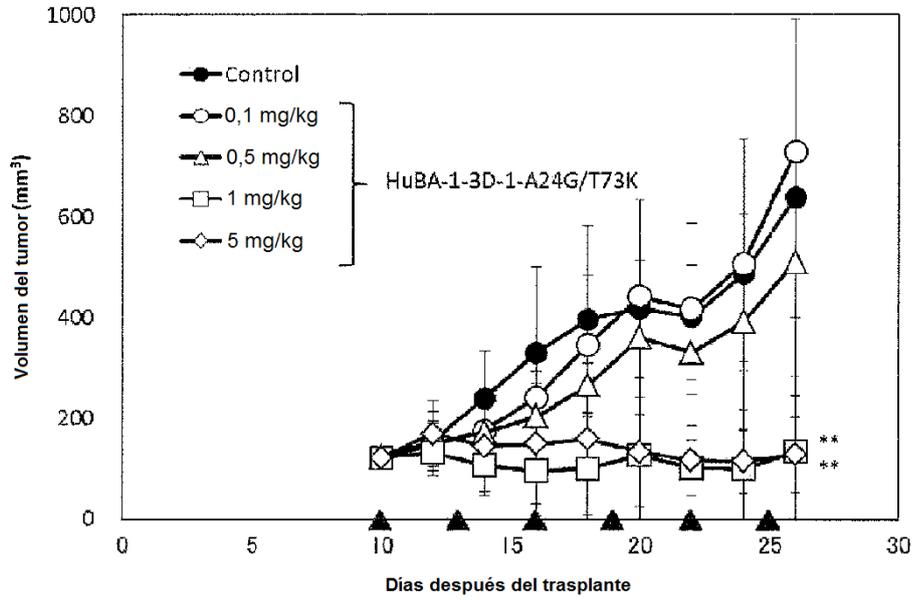


Fig. 32

A



B

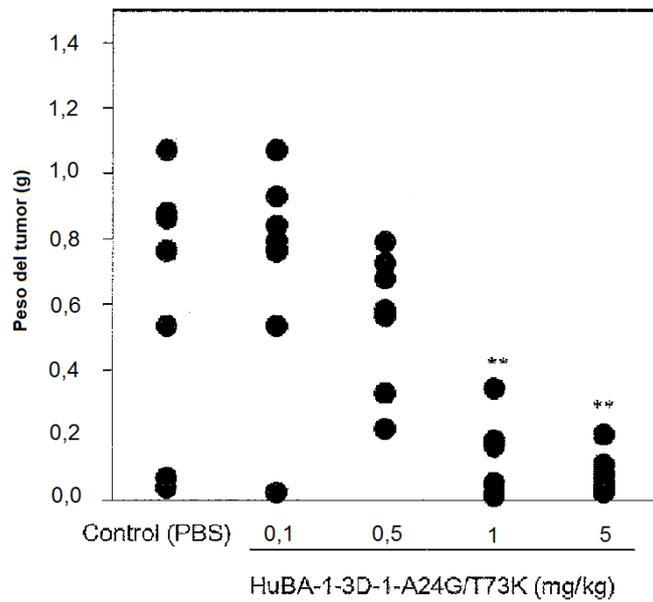
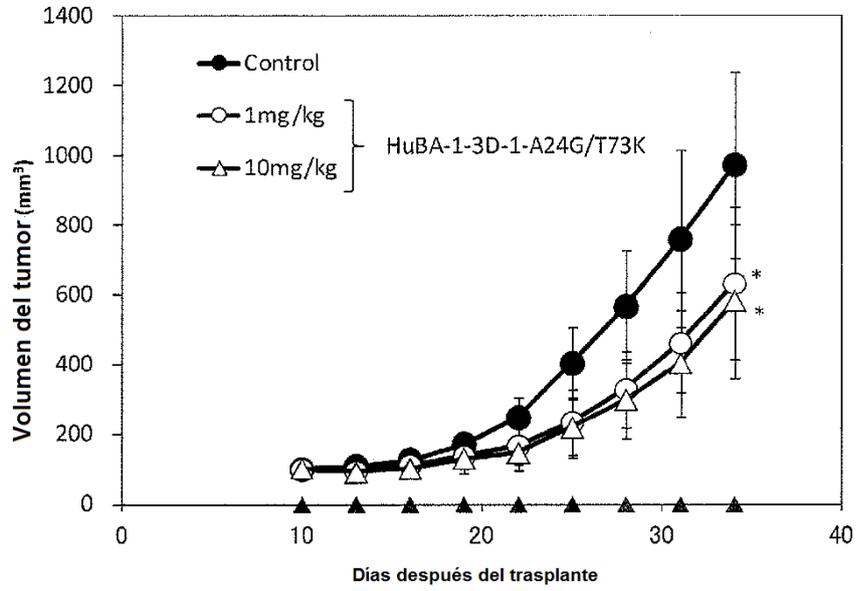


Fig. 33

A



B

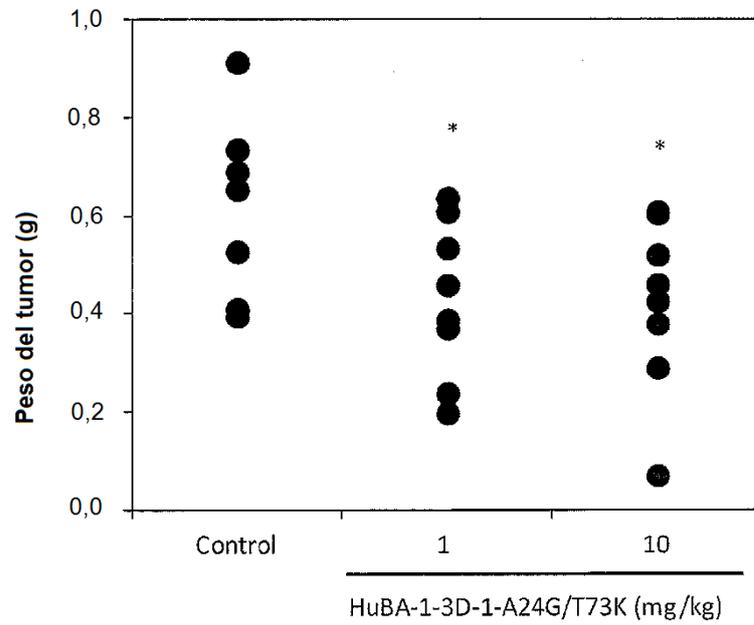


Fig. 34

