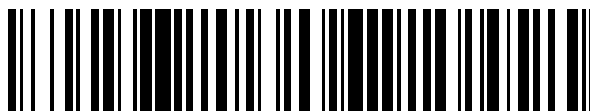


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 568**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2012 PCT/JP2012/060904**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12147713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2012 E 12776528 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2703486**

54 Título: **Anticuerpo anti-B7-H3**

30 Prioridad:

**25.04.2011 JP 2011097645**

**25.04.2011 US 201161478878 P**

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

**11.05.2018**

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)**

**3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku**

**Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**TAKAHASHI, SHU;**

**MATSUOKA, TATSUJI;**

**MURAKAMI, KENJI;**

**TAKIZAWA, TAKESHI;**

**HIROTANI, KENJI;**

**URANO, ATSUSHI;**

**FUKUCHI, KEISUKE y**

**YAZAWA, MITSUHIRO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 667 568 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-B7-H3

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a B7-H3 y es útil como agente terapéutico y/o preventivo para un tumor, y también se refiere al anticuerpo para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o prevención de un tumor.

**Técnica antecedente**

10 B7-H3 es una proteína que tiene una estructura transmembrana de un solo paso (Documento no de patente 1). El dominio extracelular N-terminal de B7-H3 contiene dos variantes. La variante 1 contiene un dominio de Ig de tipo V y uno de tipo C, respectivamente, en cada uno de dos sitios, y la variante 2 contiene un dominio de Ig de tipo V y uno de tipo C, respectivamente, en un sitio. El dominio intracelular C-terminal de B7-H3 contiene 45 aminoácidos.

15 Como receptor para B7-H3, se ha notificado TLT-2 que tiene una estructura transmembrana de un solo paso (Documento no de patente 2). Sin embargo, también existe un informe que insiste en que TLT-2 no es un receptor para B7-H3 (Documento no de patente 3). De acuerdo con el informe anterior, la activación de linfocitos T positivos para CD8 se potencia cuando el receptor está unido a B7-H3.

20 Se ha notificado clínicamente que B7-H3 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, particularmente en cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de riñón, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, y cáncer de páncreas (Documentos no de patente 4 a 11). Además, se ha notificado que, en cáncer de próstata, la intensidad de expresión de B7-H3 se correlaciona positivamente con neoplasia clinicopatológica tal como volumen tumoral, invasión extraprostática, o puntuación de Gleason, y también se correlaciona con la progresión del cáncer (Documento no de patente 8). De manera análoga, en glioblastoma multiforme, la expresión de B7-H3 se correlaciona negativamente con supervivencia libre de acontecimientos (Documento no de patente 9), y en cáncer de páncreas, la expresión de B7-H3 se correlaciona con metástasis en los ganglios linfáticos y progresión patológica (Documento no de patente 11). En cáncer de ovario, la expresión de B7-H3 se correlaciona con metástasis en los ganglios linfáticos y progresión patológica.

25 Además, se ha notificado que, introduciendo ARNip contra el gen de B7-H3 en una línea celular cancerosa positiva para B7-H3, la adhesividad a fibronectina se reduce, reduciendo de este modo la migración celular y la invasión de matrigel (Documento no de patente 12). Además, se ha notificado que, en glioblastoma multiforme, la expresión de B7-H3 permite el escape de muerte celular medida por células NK (Documento no de patente 13).

30 Por otra parte, se ha notificado que B7-H3 se expresa no solamente en células cancerosas, sino también en tumores o vasos circundantes (Documentos no de patente 5 y 14). Se ha descrito que, cuando se expresa B7-H3 en vasos sanguíneos con cáncer de ovario, la tasa de supervivencia disminuye.

35 Se ha sugerido que las moléculas de la familia de B7 están relacionadas con el sistema inmunitario. Se ha notificado que B7-H3 se expresa en monocitos, células dendríticas, y linfocitos T activados (Documento no de patente 15). Se ha notificado que, a medida que los linfocitos T citotóxicos son activados, B7-H3 coestimula la proliferación de linfocitos T positivos para CD4 o positivos para CD8. Sin embargo, también existe un informe de que B7-H3 no desempeña un papel coestimulador (Documento no de patente 1).

40 Se ha notificado que las moléculas de B7-H3 están relacionadas con enfermedades autoinmunitarias. Se ha notificado que en reumatismo y otras enfermedades autoinmunitarias, B7-H3 desempeña un papel importante en la interacción entre sinoviocitos similares a fibroblastos y linfocitos T activados (Documento no de patente 16) y que B7-H3 funciona como factor coestimulador cuando las citocinas se liberan a partir de macrófagos activados y, por lo tanto, están relacionado con la aparición de sepsis (Documento no de patente 17). Además, se ha notificado que, administrando un anticuerpo anti-B7-H3 a un modelo murino de asma durante la fase de inducción, el asma mejora debido a la supresión de la producción de citocina mediada por linfocitos Th2 en los ganglios linfáticos regionales mediante la administración de un anticuerpo anti-B7-H3 de ratón (Documento no de patente 18).

45 Con respecto a B7-H3, se ha notificado que un anticuerpo contra B7-H3 de ratón potencia linfocitos T positivos para CD8 de infiltración intratumoral y suprime el crecimiento tumoral (Documento no de patente 14). Además, hay una patente que desvela que un anticuerpo que reconoce la variante 1 de B7-H3 exhibe un efecto antitumoral in vivo sobre adenocarcinoma (Documento de patente 1).

50 El documento no de patente 19 desvela un anticuerpo monoclonal TES7 que reconoce el antígeno B7-H3-4Ig, pero no el antígeno B7-H3-2Ig, de B7-H3.

El documento de patente 2 desvela un anticuerpo monoclonal 8H9 que se une a la isoforma del dominio 4Ig del homólogo 3 de B7 humano, 4Ig-B7H3.

A pesar de estos estudios, un epítipo para un anticuerpo anti-B7-H3 que exhibe un efecto antitumoral in vivo no se

ha aclarado hasta ahora, y no se ha notificado que una secuencia de aminoácidos específica del dominio extracelular de B7-H3 sea útil como un epítipo para un anticuerpo monoclonal para tratar el cáncer.

Incluso si los anticuerpos son específicos para el mismo antígeno, las propiedades de los anticuerpos pueden variar debido a diferencias en epítipos o secuencias de los anticuerpos. Debido a la diferencia en las propiedades de los anticuerpos, cuando se administran clínicamente a seres humanos, los anticuerpos exhiben diferentes reacciones en términos de la eficacia del agente medicinal, la frecuencia de la respuesta terapéutica, la incidencia de efectos secundarios o la resistencia a fármacos, etc.

También con respecto a los anticuerpos contra B7-H3, la creación de un anticuerpo que tiene propiedades sin precedentes ha sido fuertemente demandada.

10 Documentos de la técnica relacionada

Documento de patente

Documento de patente 1: WO 2008/066691

Documento de patente 2: WO 2008/116219

Documentos no de patente

- 15 Documento no de patente 1: The Journal of Immunology, 2004, vol. 172, págs. 2352-2359  
 Documento no de patente 2: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, vol. 105, págs. 10495-10500  
 Documento no de patente 3: European journal of immunology, 2009, vol. 39 págs. 1754-1764  
 Documento no de patente 4: Lung Cancer, 2009, vol. 66, págs. 245-249  
 20 Documento no de patente 5: Clinical Cancer Research, 2008, vol. 14, págs. 5150-5157  
 Documento no de patente 6: Clinical Cancer Research 2008, vol. 14, págs. 4800-4808  
 Documento no de patente 7: Cancer Immunology, Immunotherapy, 2010, vol. 59, págs. 1163-1171  
 Documento no de patente 8: Cancer Research, 2007, vol. 67, págs. 7893-7900  
 Documento no de patente 9: Histopathology, 2008, vol. 53, págs. 73-80  
 25 Documento no de patente 10: Modern Pathology, 2010, vol. 23, págs. 1104-1112  
 Documento no de patente 11: British Journal of Cancer, 2009, vol. 101, págs. 1709-1716  
 Documento no de patente 12: Current Cancer Drug Targets, 2008, vol. 8, págs. 404-413  
 Documento no de patente 13: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, vol. 101, págs. 12640-12645  
 30 Documento no de patente 14: Modern Pathology, 2010, vol. 23, págs. 1104-1112  
 Documento no de patente 15: Nature Immunology, 2001, vol. 2, págs. 269-274  
 Documento no de patente 16: The Journal of Immunology, 2008, vol. 180, págs. 2989-2998  
 Documento no de patente 17: The Journal of Immunology, 2010, vol. 185, págs. 3677-3684  
 Documento no de patente 18: The Journal of Immunology, 2008, vol. 181, págs. 4062-4071  
 35 Documento no de patente 19: American Association for Cancer Research. Proceedings of the Annual Meeting, 2008 de abril, vol. 49, página 606.

## **Sumario de la invención**

### **Problemas a resolver por la invención**

40 Un objeto de la invención es proporcionar un anticuerpo y un fragmento funcional del anticuerpo a usar en un producto farmacéutico que tenga un efecto terapéutico sobre un tumor, y proporcionar un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor, y similares.

### **Medios para resolver los problemas**

Los inventores de la presente invención realizaron estudios exhaustivos con el fin de conseguir el objeto anterior y, como resultado, descubrieron un anticuerpo que se une específicamente a B7-H3 que exhibe una actividad antitumoral y, de este modo, completaron la invención. Es decir, la invención incluye las siguientes invenciones.

(1) Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, caracterizado por tener las siguientes propiedades de:

- (a) unirse específicamente a B7-H3, en el que B7-H3 es una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 o 10, y el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo se une a un polipéptido que consiste en IgC2, en el que IgC2 es un dominio de B7-H3;  
 50 (b) tener una actividad de fagocitosis mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCP);  
 (c) tener una actividad antitumoral in vivo, y  
 (d) tener una actividad inhibidora competitiva contra el anticuerpo M30 para la unión a B7-H3, en el que el anticuerpo M30 comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que comprende una

secuencia de aminoácidos que consiste en los restos 23 a 235 de la SEQ ID NO: 53.

(2) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el (1) anterior, que se une a IgC1 e IgC2, cada uno de los cuales es un dominio de B7-H3.

(3) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el (1) o (2) anterior, en el que IgC2 es un dominio que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 358 a 456 en la SEQ ID NO: 6.

(4) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el (2) anterior, en el que IgC1 es un dominio que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 140 a 244 en la SEQ ID NO: 6.

(5) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el (1) a (4) anterior, que tiene una actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

(6) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (5) anteriores, en el que el tumor es cáncer.

(7) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el (6) anterior, en el que el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de esófago o cáncer de riñón.

(8) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (7) anteriores, que comprende CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 92, CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 93, y CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 94 como regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada y comprende CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 95, CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 96, y CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 97 como regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera.

(9) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (8) anteriores, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 51 y una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 23 a 130 en la SEQ ID NO: 53.

(10) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (9) anteriores, en el que una región constante es una región constante derivada de ser humano.

(11) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el (10) anterior, que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 63 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 59.

(12) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (11) anteriores que está humanizado.

(13) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el (12) anterior, que comprende: una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 85, (b) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 87, (c) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 89, (d) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 91, (e) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % o más con cualquiera de las secuencias (a) a (d), y (f) una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se eliminan, sustituyen o añaden en cualquiera de las secuencias (a) a (d); y una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en (g) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 71, (h) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 73, (i) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 75, (j) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 77, (k) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 79, (l) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 81, (m) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 83, (n) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % o más con cualquiera de las secuencias (g) a (m), y (o) una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se eliminan, sustituyen o añaden en cualquiera de las secuencias (g) a (m).

(14) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el (13) anterior, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionadas entre el grupo que consiste en: una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 71; una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 73;



que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 75; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 77; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 79; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 81; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 83; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 75; y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 77.

(17) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (16) anteriores, en el que el fragmento funcional se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fab' y Fv.

(18) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (16) anteriores, que comprende una primera y una segunda cadenas pesadas, en el que la primera y la segunda cadenas pesadas se seleccionan, cada una, independientemente entre los siguientes (i) a (iii):

(i) una cadena pesada de longitud completa;

(ii) una cadena pesada en la que 1 aminoácido se elimina del extremo carboxilo de la cadena pesada; o

(iii) una cadena pesada en la que 2 aminoácidos se eliminan del extremo carboxilo de la cadena pesada,

preferentemente en el que la primera y la segunda cadenas pesadas se seleccionan, cada una, entre el punto (ii).

(19) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el (18) anterior, en el que la primera y la segunda cadenas pesadas se seleccionan, cada una, independientemente entre los puntos (ii) o (iii), y en el que el resto de aminoácido ubicado en el extremo carboxilo de la cadena pesada está amidado, preferentemente en el que el resto de aminoácido es un resto de prolina.

(20) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (19) anteriores, en el que el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo es una variante modificada que comprende una modificación seleccionada entre el grupo que consiste en: enlace de una fracción química a un resto de aminoácido, una cadena de carbohidrato enlazada a N o enlazada a O, glucosilación enlazada a N o enlazada a O, procesamiento N- o C-terminal, desamidación, isomerización de un resto de ácido aspártico, oxidación de un resto de metionina, y adición de un resto de metionina al extremo N.

(21) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (20) anteriores, en el que la modificación de un glicano está regulada para potenciar una actividad citotóxica celular dependiente del anticuerpo.

(22) Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los (1) a (17) anteriores.

(23) El polinucleótido de acuerdo con el (22) anterior, que comprende una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 58 a 423 en la SEQ ID NO: 50 y una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 67 a 390 en la SEQ ID NO: 52.

(24) El polinucleótido de acuerdo con el (22) o (23) anterior, que comprende una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 62 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 58.

(25) El polinucleótido de acuerdo con el (22) o (23) anterior, que comprende: una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en (a) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 58 a 423 en la SEQ ID NO: 84, (b) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 58 a 423 en la SEQ ID NO: 86, (c) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 58 a 423 en la SEQ ID NO: 88, (d) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 58 a 423 en la SEQ ID NO: 90, y (e) una secuencia de nucleótidos que comprende un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a) a (d) en condiciones rigurosas; y una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en (f) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 384 en la SEQ ID NO: 70, (g) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 384 en la SEQ ID NO: 72, (h) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 384 en la SEQ ID NO: 74, (i) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 384 en la SEQ ID NO: 76, (j) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 384 en la SEQ ID NO: 78, (k) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 384 en la SEQ ID NO: 80, (l) una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 384 en la SEQ ID NO: 82, y (m) una secuencia de nucleótidos que comprende un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias



(30) Una célula hospedadora, que está transformada con el vector de expresión de acuerdo con el (29) anterior.

(31) La célula hospedadora de acuerdo con el (30) anterior, en la que la célula hospedadora es una célula eucariota.

5 (32) Un procedimiento de producción de un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, caracterizado por comprender una etapa de cultivar la célula hospedadora de acuerdo con el (30) o (31) anterior y una etapa de recoger un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo deseado de un producto cultivado obtenido en la etapa de cultivo.

(33) Una composición farmacéutica, caracterizada por comprender al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con los (1) a (21) anteriores.

10 (34) La composición farmacéutica de acuerdo con el (33) anterior, que es para tratar un tumor.

(35) Una composición farmacéutica para tratar un tumor, caracterizada por comprender al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con los (1) a (21) anteriores y al menos un agente terapéutico para el cáncer.

15 (36) El anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con los (1) a (21) anteriores, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor.

(37) El anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con los (1) a (21) anteriores, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor, comprendiendo el procedimiento administrar el anticuerpo o fragmento funcional y al menos un agente terapéutico para el cáncer simultáneamente, por separado o secuencialmente a un individuo.

20 (38) La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con el (34) o (35) anterior o el anticuerpo o fragmento funcional para su uso de acuerdo con el (36) o (37) anterior, en el que el tumor es cáncer.

(39) La composición farmacéutica, anticuerpo o fragmento funcional de acuerdo con el (38) anterior, en el que el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de esófago o

25 cáncer de riñón.

### **Ventaja de la invención**

De acuerdo con la invención, puede obtenerse un agente terapéutico o similar para cáncer que comprende un anticuerpo que se une a B7-H3 y tiene una actividad antitumoral contra células cancerosas.

### **Breve descripción de los dibujos**

30 [Figura 1] La figura 1 es una vista que muestra la presencia o ausencia de actividad ADCP de un anticuerpo anti-B7-H3 contra células NCI-H322. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=3).

[Figura 2] La figura 2 es una vista que muestra la presencia o ausencia de actividad ADCP de un anticuerpo anti-B7-H3 disponible en el mercado contra células NCI-H322.

35 [Figura 3] La figura 3 es una vista que muestra la presencia o ausencia de actividad ADCP de anticuerpo M30 contra células 293 transfectadas con vector vacío y células 293 que expresan B7-H3. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=3). En el dibujo, el "simulacro" indica la actividad ADCC de M30 contra células 293 transfectadas con vector vacío, y el "B7H3" indica la actividad ADCC de M30 contra células 293 que expresan B7-H3.

40 [Figura 4] La figura 4 es una vista que muestra la presencia o ausencia de actividad CDC de un anticuerpo anti-B7-H3 contra células NCI-H322. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=3).

[Figura 5-1] La figura 5-1 es una vista que muestra la reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgV1). La línea de puntos indica la propiedad de unión de un anticuerpo de control, y la línea continua indica la propiedad de unión de un anticuerpo M30.

45 [Figura 5-2] La figura 5-2 es una vista que muestra la reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgC1). La línea de puntos indica la propiedad de unión de un anticuerpo de control, y la línea continua indica la propiedad de unión de un anticuerpo M30.

[Figura 5-3] La figura 5-3 es una vista que muestra la reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgV2). La línea de puntos indica la propiedad de unión de un anticuerpo de control, y la línea continua indica la propiedad de unión de un anticuerpo M30.

50 [Figura 5-4] La figura 5-4 es una vista que muestra la reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgC2). La línea de puntos indica la propiedad de unión de un anticuerpo de control, y la línea continua indica la propiedad de unión de un anticuerpo M30.

[Figura 5-5] La figura 5-5 es una vista que muestra la reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgC1-V2-C2). La línea de puntos indica la propiedad de unión de un anticuerpo de control, y la línea continua indica la propiedad de unión de un anticuerpo M30.

55 [Figura 5-6] La figura 5-6 es una vista que muestra la reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgV2-C2). La línea de puntos indica la propiedad de unión de un anticuerpo de control, y la línea continua indica la propiedad de unión de un anticuerpo M30.

[Figura 6] La figura 6 es una vista que muestra las actividades antitumorales de anticuerpos anti-B7-H3 contra ratones implantados con células NCI-H322. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=10).

60 [Figura 7] La figura 7 es una vista que muestra la actividad antitumoral de anticuerpo anti-M30 cuando se agotaron macrófagos in vivo. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=8). Además, "mm<sup>3</sup>" indica "mm<sup>3</sup>".



- [Figura 8] La figura 8 es una vista que muestra las actividades ADCP de anticuerpo M30 y anticuerpo cM30 contra células NCI-H322. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=4).
- [Figura 9] La figura 9 es una vista que muestra las actividades antitumorales de anticuerpo M30 y anticuerpo cM30 contra ratones implantados con células MDA-MB-231. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=9).
- 5 [Figura 10-1] La figura 10-1 es una vista que muestra las actividades inhibitoras competitivas de anticuerpo cM30 y anticuerpo M30-H1-L4 contra M30 por la unión a un antígeno polipeptídico del dominio extracelular de un antígeno de variante 1 de B7-H3. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=3).
- [Figura 10-2] La figura 10-2 es una vista que muestra las actividades inhibitoras competitivas de anticuerpo cM30 y anticuerpo M30-H1-L4 contra M30 por la unión a un antígeno polipeptídico del dominio extracelular de un antígeno de variante 2 de B7-H3. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=3).
- 10 [Figura 11] La figura 11 es una vista que muestra las actividades ADCP de anticuerpo M30, anticuerpo cM30 y anticuerpo M30-H1-L4 contra células NCI-H322. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=4).
- 15 [Figura 12] La figura 12 es una vista que muestra las actividades ADCC de anticuerpo cM30 y anticuerpo M30-H1-L4 contra células NCI-H322. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=3).
- [Figura 13-1] La figura 13-1 muestra una secuencia de nucleótidos de la variante 1 de B7-H3 (SEQ ID NO: 5).
- [Figura 13-2] La figura 13-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la variante 1 de B7-H3 (SEQ ID NO: 6).
- 20 [Figura 14-1] La figura 14-1 muestra una secuencia de nucleótidos de la variante 2 de B7-H3 (SEQ ID NO: 9).
- [Figura 14-2] La figura 14-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la variante 2 de B7-H3 (SEQ ID NO: 10).
- [Figura 15-1] La figura 15-1 muestra una secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgV1 (SEQ ID NO: 20).
- [Figura 15-2] La figura 15-2 muestra una secuencia de aminoácidos del B7-H3 IgV1 (SEQ ID NO: 21).
- [Figura 16-1] La figura 16-1 muestra una secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 22).
- [Figura 16-2] La figura 16-2 muestra una secuencia de aminoácidos del B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 23).
- 25 [Figura 17-1] La figura 17-1 muestra una secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 24).
- [Figura 17-2] La figura 17-2 muestra una secuencia de aminoácidos del B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 25).
- [Figura 18-1] La figura 18-1 muestra una secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 26).
- [Figura 18-2] La figura 18-2 muestra una secuencia de aminoácidos del B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 27).
- 30 [Figura 19-1] La figura 19-1 muestra una secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 28).
- [Figura 19-2] La figura 19-2 muestra una secuencia de aminoácidos del B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 29).
- [Figura 20-1] La figura 20-1 muestra una secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 30).
- [Figura 20-2] La figura 20-2 muestra una secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 31).
- [Figura 21-1] La figura 21-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 50).
- 35 [Figura 21-2] La figura 21-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 51).
- [Figura 22-1] La figura 22-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 52).
- [Figura 22-2] La figura 22-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 53).
- 40 [Figura 23] La figura 23 muestra una secuencia de nucleótidos de una señal secretora de cadena κ humana, una región constante de cadena κ humana y una señal adicional poli-A humana (SEQ ID NO: 56).
- [Figura 24] La figura 24 muestra una secuencia de nucleótidos de una secuencia señal y una región constante de IgG1 humana (SEQ ID 57).
- 45 [Figura 25-1] La figura 25-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo quimera de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 58).
- [Figura 25-2] La figura 25-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo quimera de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 59).
- [Figura 26-1] La figura 26-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo quimera de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 62).
- 50 [Figura 26-2] La figura 26-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo quimera de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 63).
- [Figura 27-1] La figura 27-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo M30-L1 (SEQ ID NO: 70).
- 55 [Figura 27-2] La figura 27-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L1 (SEQ ID NO: 71).
- [Figura 28-1] La figura 28-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo M30-L2 (SEQ ID NO: 72).
- [Figura 28-2] La figura 28-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L2 (SEQ ID NO: 73).
- 60 [Figura 29-1] La figura 29-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo M30-L3 (SEQ ID NO: 74).
- [Figura 29-2] La figura 29-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L3 (SEQ ID NO: 75).
- 65 [Figura 30-1] La figura 30-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo M30-L4 (SEQ ID NO: 76).

[Figura 30-2] La figura 30-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L4 (SEQ ID NO: 77).

[Figura 31-1] La figura 31-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo M30-L5 (SEQ ID NO: 78).

5 [Figura 31-2] La figura 31-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L5 (SEQ ID NO: 79).

[Figura 32-1] La figura 32-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo M30-L6 (SEQ ID NO: 80).

10 [Figura 32-2] La figura 32-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L6 (SEQ ID NO: 81).

[Figura 33-1] La figura 33-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo M30-L7 (SEQ ID NO: 82).

[Figura 33-2] La figura 33-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L7 (SEQ ID NO: 83).

15 [Figura 34-1] La figura 34-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo M30-H1 (SEQ ID NO: 84).

[Figura 34-2] La figura 34-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H1 (SEQ ID NO: 85).

20 [Figura 35-1] La figura 35-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo M30-H2 (SEQ ID NO: 86).

[Figura 35-2] La figura 35-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H2 (SEQ ID NO: 87).

[Figura 36-1] La figura 36-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo M30-H3 (SEQ ID NO: 88).

25 [Figura 36-2] La figura 36-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H3 (SEQ ID NO: 89).

[Figura 37-1] La figura 37-1 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo M30-H4 (SEQ ID NO: 90).

30 [Figura 37-2] La figura 37-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H4 (SEQ ID NO: 91).

[Figura 38] La figura 38 es una vista que muestra la actividad antitumoral de un anticuerpo M30 humanizado (M30-H1-L4) contra ratones implantados con células MDA-MB-231. Las barras de error en el dibujo representan errores estándar (n=6).

### **Modo de llevar a cabo la invención**

35 Los términos "cáncer" y "tumor", tal como se usan en el presente documento, se usan con el mismo significado.

El término "gen", tal como se usa en el presente documento, incluye no solamente ADN, sino también ARNm del mismo, ADNc del mismo y ARNc del mismo.

El término "polinucleótido", tal como se usa en el presente documento, se usa con el mismo significado que un ácido nucleico y también incluye ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos y cebadores.

40 Los términos "polipéptido" y "proteína", tal como se usan en el presente documento, se usan indistintamente.

El término "célula", tal como se usa en el presente documento, también incluye células en un individuo animal y células cultivadas.

El término "B7-H3", tal como se usa en el presente documento, se usa con el mismo significado que proteína B7-H3, y también se refiere a la variante 1 de B7-H3 y/o la variante 2 de B7-H3.

45 La expresión "lesión celular", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un estado en el que se provoca un cambio patológico a células de alguna manera, y la lesión celular no está limitada a lesión directa e incluye toda clase de daño a la estructura y la función de células, tal como escisión de ADN, formación de base-dímero, escisión cromosómica, daño a la maquinaria de división celular y una disminución de diversas actividades enzimáticas.

50 La expresión "actividad citotóxica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la actividad de provocar la lesión celular descrita anteriormente.

La expresión "actividad de fagocitosis mediada por células dependiente del anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a "actividad de fagocitosis de células dependiente del anticuerpo (ADCP)" y significa la actividad de fagocitar células diana tales como células tumorales mediante monocitos o macrófagos, mediada por un anticuerpo. La expresión también se denomina "actividad de fagocitosis dependiente del anticuerpo".

55 La expresión "actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a "actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC)" y significa la actividad de dañar células diana tales como células tumorales mediante células, NK mediada por un anticuerpo.

La expresión "actividad de citotoxicidad dependiente del complemento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a "actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" y significa la actividad de dañar células diana tales como células tumorales mediante el complemento, mediada por un anticuerpo.

5 La expresión "fragmento funcional de un anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento parcial de un anticuerpo que tiene una actividad de unión al antígeno, en la que el fragmento tiene una función completa o parcial del anticuerpo, incluyendo Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, y similares. El término también incluye Fab' que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenido tratando F(ab')<sub>2</sub> en condiciones reductoras. Sin embargo, el término no está limitado a estas moléculas siempre que el fragmento tenga una afinidad de unión por un antígeno. Además, estos fragmentos funcionales incluyen no solamente un fragmento obtenido  
10 tratando una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima apropiada, pero también una proteína producida en una célula hospedadora apropiada usando un gen de anticuerpo genéticamente modificado.

El término "Fab", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenido tratando F(ab')<sub>2</sub> en condiciones reductoras tal como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, Fab' producido usando un gen de anticuerpo genéticamente modificado también está incluido en el Fab' de la invención.  
15

El término "epítipo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido parcial o una estructura terciaria parcial de B7-H3 a la que se une un anticuerpo anti-B7-H3 específico. El epítipo que es un péptido parcial de la B7-H3 descrita anteriormente puede determinarse mediante un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia, tal como un inmunoensayo, y por ejemplo, puede emplearse el siguiente procedimiento. En primer lugar, se producen diversas estructuras parciales de un antígeno. En la producción de las estructuras parciales, puede usarse una técnica de síntesis de oligopéptidos conocida. Por ejemplo, una serie de polipéptidos que tienen longitudes apropiadamente reducidas obtenidas por acortamiento secuencial de B7-H3 desde el extremo C o el extremo N se producen usando una técnica de recombinación genética conocida por los expertos en la materia. A  
20 continuación, la reactividad de un anticuerpo contra estos polipéptidos se examina y se determina aproximadamente un sitio de reconocimiento. A continuación, se sintetizan péptidos que tienen longitudes más cortas y se examina la reactividad del anticuerpo con estos péptidos, con lo que el epítipo puede determinarse. Además, el epítipo, que es una estructura terciaria parcial de un antígeno al que se une un anticuerpo específico, puede determinarse especificando los restos de aminoácidos del antígeno que son adyacentes al anticuerpo,  
25 mediante análisis estructural por rayos X.  
30

La frase "anticuerpos que se unen al mismo epítipo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a diferentes anticuerpos que se unen a un epítipo común. Si un segundo anticuerpo se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la que se une un primer anticuerpo, se puede determinar que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo. Además, al confirmar que un segundo anticuerpo compite con un primer anticuerpo por la unión a un antígeno (es decir, el segundo anticuerpo inhibe la unión entre el primer anticuerpo y el antígeno), se puede determinar que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura del epítipo específico. Además, cuando el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo y también el primer anticuerpo tiene una actividad especial tal como una actividad antitumoral, se puede esperar que el segundo anticuerpo también tenga la misma actividad. Por consiguiente, cuando un segundo anticuerpo anti-B7-H3 se une a un péptido parcial al que se une un primer anticuerpo anti-B7-H3, se puede determinar que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo de B7-H3. Además, al confirmar que un segundo anticuerpo anti-B7-H3 compite con un primer anticuerpo anti-B7-H3 por la unión a B7-H3, se puede determinar que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo son anticuerpos que se unen al mismo epítipo de B7-H3.  
35  
40

El término "CDR", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región determinante de la complementariedad (CDR), y se sabe que cada cadena pesada y ligera de una molécula de anticuerpo tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La CDR también se denomina región hipervariable y está presente en una región variable de cada cadena pesada y ligera de un anticuerpo. Es un sitio que tiene una variabilidad inusualmente alta en su estructura primaria, y hay tres CDR independientes en la estructura primaria de cada cadena polipeptídica pesada y ligera. En la presente memoria descriptiva, con respecto a las CDR de un anticuerpo, las CDR de la cadena pesada están representadas por CDRH1, CDRH2 y CDRH3 desde el lado amino terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, y las CDR de la cadena ligera están representadas por CDRL1, CDRL2 y CDRL3 desde el lado amino terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios están próximos entre sí en la estructura terciaria y determinan la especificidad para un antígeno al que se une el anticuerpo.  
45  
50  
55

La frase "la hibridación se realiza en condiciones rigurosas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento en el que la hibridación se realiza en condiciones en las cuales se puede lograr la identificación realizando hibridación a 68 °C en una solución de hibridación disponible en el mercado ExpressHyb Hybridization Solution (fabricada por Clontech, Inc.) o realizando hibridación a 68 °C en presencia de NaCl de 0,7 a 1,0 M usando un filtro que tiene ADN inmovilizado sobre él, seguido de realizar lavado a 68 °C usando solución 0,1 a 2 x de SSC (1 x solución de SSC está compuesta por NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) o en condiciones equivalentes a  
60

las mismas.

1. B7-H3

B7-H3 es un miembro de la familia B7 expresado en células presentadoras de antígenos como una molécula coestimuladora, y se considera que actúa sobre un receptor en linfocitos T para potenciar o suprimir la actividad inmunitaria.

B7-H3 es una proteína que tiene una estructura transmembrana de un solo paso, y el dominio extracelular N-terminal de B7-H3 contiene dos variantes. La variante 1 de B7-H3 (4Ig-B7-H3) contiene un dominio de Ig de tipo V o de tipo C en dos sitios, respectivamente, y la variante 2 de B7-H3 (2Ig-B7-H3) contiene un dominio de Ig de tipo V o de tipo C en un sitio, respectivamente.

En cuanto a que B7-H3 se use para fabricar productos de la invención, B7-H3 puede purificarse directamente a partir de células que expresan B7-H3 de un ser humano o un mamífero no humano (tal como una rata o un ratón) y usarse, o puede prepararse y usarse una fracción de membrana celular de las células descritas anteriormente. Además, B7-H3 se puede obtener mediante síntesis *in vitro* de la misma o producción de la misma en una célula hospedadora mediante ingeniería genética. En dicha ingeniería genética, específicamente, después de que el ADNc de B7-H3 se integre en un vector capaz de expresar ADNc de B7-H3, se puede obtener B7-H3 sintetizándola en una solución que contiene enzimas, sustratos y sustancias energéticas requeridas para la transcripción y la traducción, o expresando B7-H3 en otra célula hospedadora transformada procarionota o eucariota.

La secuencia de nucleótidos de un marco de lectura abierto (ORF) de un gen de la variante 1 de B7-H3 humana está representada por la SEQ ID NO: 5 en el listado de secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias. Además, las secuencias de las SEQ ID NO: 5 y 6 se muestran en la figura 13.

La secuencia de nucleótidos de un ORF de un gen de la variante 2 de B7-H3 humana está representada por la SEQ ID NO: 9 en el listado de secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias. Además, las secuencias de las SEQ ID NO: 9 y 10 se muestran en la figura 14.

Además, una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan y/o añaden en cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente de B7-H3 y también tiene una actividad biológica equivalente a la de la proteína está también incluida en B7-H3.

La variante 1 de B7-H3 humana madura de la que se ha eliminado la secuencia señal corresponde a una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 27 a 534 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 6. Además, la variante 2 de B7-H3 humana madura de la que se ha eliminado la secuencia señal corresponde a una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 27 a 316 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 10.

En la variante 1 de B7-H3, los respectivos dominios están presentes en el orden de IgV1, IgC1, IgV2 e IgC2 desde el extremo N, y en la SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias, IgV1 corresponde a los números de aminoácidos 27 a 139, IgC1 corresponde a los números de aminoácidos 140 a 244, IgV2 corresponde a los números de aminoácidos 245 a 357 e IgC2 corresponde a los números de aminoácidos 358 a 456. Además, en la variante 2 de B7-H3, los respectivos dominios están presentes en el orden de IgV1 e IgC2 desde el extremo N, y en la SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias, IgV1 corresponde a los números de aminoácidos 27 a 140 e IgC2 corresponde a los números de aminoácidos 141 a 243.

El ADNc de B7-H3 puede obtenerse mediante, por ejemplo, un llamado procedimiento de PCR en el que se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo denominada "PCR") usando una biblioteca de ADNc que expresa ADNc de B7-H3 como molde y cebadores que amplifican específicamente el ADNc de B7-H3 (Saiki, R. K., y col., Science, (1988) 239, 487-49). Por cierto, un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 5 o 9 en el listado de secuencias en condiciones rigurosas y codifica una proteína que tiene una actividad biológica equivalente a la de B7-H3 también está incluido en ADNc de B7-H3. Además, un polinucleótido que es una variante de corte y empalme transcrita a partir del locus de B7-H3 humano o de ratón o un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al mismo en condiciones rigurosas y codifica una proteína que tiene una actividad biológica equivalente a la de B7-H3 también está incluido en ADNc de B7-H3.

Además, una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan o añaden en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 o 10 en el listado de secuencias o una secuencia de aminoácidos obtenida eliminando la secuencia señal de cualquiera de estas secuencias y tiene una actividad biológica equivalente a la de B7-H3 está también incluida en B7-H3. Además, una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de corte y empalme transcrita a partir del locus B7-H3 humano o de ratón o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan o añaden en la secuencia de aminoácidos anterior y tiene una actividad biológica equivalente a

la de B7-H3 está también incluida en B7-H3.

## 2. Producción del anticuerpo anti-B7-H3

5 El anticuerpo de la invención contra B7-H3, tal como se describe en el presente documento, puede obtenerse inmunizando un animal con B7-H3 o un polipéptido arbitrario seleccionado entre la secuencia de aminoácidos de B7-H3, y recogiendo y purificando el anticuerpo producido in vivo de acuerdo con procedimientos comunes. La especie biológica de B7-H3 que se usará como antígeno no está limitada al ser humano, y puede inmunizarse un animal con B7-H3 derivado de un animal que no sea humano, tal como un ratón o una rata. En este caso, examinando la reactividad cruzada entre un anticuerpo que se une al B7-H3 heterólogo obtenido y B7-H3 humano, puede seleccionarse un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

10 Además, se puede obtener un anticuerpo monoclonal a partir de un hibridoma establecido fusionando células productoras de anticuerpos que producen un anticuerpo contra B7-H3 con células de mieloma, de acuerdo con procedimientos conocidos (por ejemplo, Kohler and Milstein, *Nature*, (1975) 256, págs. 495-497; Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, págs. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

15 Por cierto, puede obtenerse B7-H3 que se usará como un antígeno expresando el gen de B7-H3 en una célula hospedadora usando ingeniería genética.

Específicamente, se produce un vector capaz de expresar el gen de B7-H3, y el vector resultante se transfecta en una célula hospedadora para expresar el gen, y a continuación, se purifica la B7-H3 expresada. En lo sucesivo en el presente documento, se describirá específicamente un procedimiento para obtener un anticuerpo contra B7-H3.

### (1) Preparación del antígeno

20 Los ejemplos del antígeno que se usará para producir el anticuerpo anti-B7-H3 incluyen B7-H3, un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos parcial que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de B7-H3, y un derivado obtenido añadiendo una secuencia de aminoácidos o vehículo dado al mismo.

25 B7-H3 puede purificarse directamente a partir de tejidos tumorales o células tumorales humanas y usarse. Además, B7-H3 se puede obtener sintetizándolo in vitro o produciéndolo en una célula hospedadora mediante ingeniería genética.

Con respecto a dicha ingeniería genética, específicamente, después de que el ADNc de B7-H3 se integre en un vector capaz de expresar ADNc de B7-H3, se puede obtener B7-H3 sintetizándola en una solución que contiene enzimas, sustratos y sustancias energéticas requeridas para la transcripción y la traducción, o expresando B7-H3 en otra célula hospedadora transformada procariota o eucariota.

30 Además, el antígeno también puede obtenerse como una proteína secretora expresando una proteína de fusión obtenida ligando el dominio extracelular de B7-H3, que es una proteína de membrana, a la región constante de un anticuerpo en un sistema hospedador-vector apropiado.

35 El ADNc de B7-H3 puede obtenerse mediante, por ejemplo, un llamado procedimiento de PCR en el que se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo denominada "PCR") usando una biblioteca de ADNc que expresa ADNc de B7-H3 como molde y cebadores que amplifican específicamente el ADNc de B7-H3 (véase, Saiki, R. K., y col., *Science*, (1988) 239, págs. 487-489).

Como sistema para síntesis in vitro del polipéptido, por ejemplo, puede indicarse como ejemplo el sistema Rapid Translation System (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc., aunque sin limitarse al mismo.

40 Los ejemplos de células hospedadoras procariotas incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Con el fin de transformar las células hospedadoras con un gen diana, las células hospedadoras se transforman mediante un vector plasmídico que comprende un replicón, es decir, un origen de replicación derivado de una especie compatible con el hospedador, y una secuencia reguladora. Además, el vector tiene preferentemente una secuencia capaz de imponer selectividad fenotípica en la célula transformada.

45 Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas incluyen células de vertebrados, células de insectos y células de levadura. Como células de vertebrados, por ejemplo, a menudo se usan células COS de simio (Gluzman, Y., *Cell*, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC n.º CRL-1658) y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, LA, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1980) 77, págs. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO, ATCC: CCL-61); y similares, sin embargo, las células no se limitan a éstas.

50 El transformante obtenido de este modo se puede cultivar de acuerdo con procedimientos comunes, y cultivando el transformante, se produce un polipéptido diana intracelular o extracelularmente.

Un medio adecuado para usarlo para el cultivo puede seleccionarse entre diversos medios de cultivo usados comúnmente dependiendo de las células hospedadoras empleadas. Si se emplea *Escherichia coli*, por ejemplo, se

puede usar un medio LB suplementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG, según sea necesario.

Una proteína recombinante producida intracelular o extracelularmente por el transformante a través de dicho cultivo puede separarse y purificarse mediante cualquiera de diversos procedimientos de separación conocidos que utilizan las propiedades físicas o químicas de la proteína.

- 5 Los ejemplos específicos de los procedimientos incluyen tratamiento con un precipitante de proteína común, ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida tales como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, diálisis y una combinación de los mismos.

- 10 Además, uniendo un identificador de seis restos de histidina a una proteína recombinante a expresar, la proteína puede purificarse eficazmente con una columna de afinidad de níquel. Como alternativa, uniendo la región Fc de IgG a una proteína recombinante a expresar, la proteína puede purificarse eficazmente con una columna de proteína A.

Combinando los procedimientos descritos anteriormente, se puede producir fácilmente una gran cantidad de un polipéptido diana con alto rendimiento y alta pureza.

(2) Producción del anticuerpo monoclonal anti-B7-H3

- 15 Los ejemplos del anticuerpo que se une específicamente a B7-H3 incluyen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a B7-H3, y a continuación se describe un procedimiento de obtención de dicho anticuerpo.

La producción de un anticuerpo monoclonal generalmente requiere las siguientes etapas operativas de:

- 20 (a) purificar un biopolímero que se usará como antígeno;  
 (b) preparar células productoras de anticuerpos inmunizando un animal mediante inyección del antígeno, recoger la sangre, ensayar su título de anticuerpos para determinar cuándo se escinde el bazo;  
 (c) preparar células de mieloma (en lo sucesivo denominadas como "mieloma");  
 (d) fusionar las células productoras de anticuerpos con el mieloma;  
 (e) cribar un grupo de hibridomas que producen un anticuerpo deseado;  
 (f) dividir los hibridomas en clones de una sola célula (clonación);  
 25 (g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal implantado con el hibridoma para producir una gran cantidad de un anticuerpo monoclonal;  
 (h) examinar el anticuerpo monoclonal producido de este modo para la actividad biológica y la especificidad de unión, o examinar las propiedades del anticuerpo como un reactivo de anticuerpo etiquetado; y similares.

- 30 En lo sucesivo en el presente documento, el procedimiento de producción de un anticuerpo monoclonal se describirá en detalle siguiendo las etapas anteriores, sin embargo, el procedimiento no se limita a esto, y, por ejemplo, pueden usarse células productoras de anticuerpos diferentes de células esplénicas y mieloma.

(a) Purificación de antígeno

Como antígeno, se puede usar B7-H3 preparada mediante el procedimiento descrito anteriormente o un péptido parcial de la misma.

- 35 Además, también se puede usar una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresan B7-H3 o las propias células recombinantes que expresan B7-H3, y también se puede usar como antígeno un péptido parcial de la proteína tal como se describe en el presente documento químicamente sintetizado mediante un procedimiento conocido por los expertos en la materia.

(b) Preparación de células productoras de anticuerpos

- 40 El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund o sulfato de aluminio y potasio y la mezcla resultante se usa como inmunógeno para inmunizar un animal experimental. Como animal experimental, puede usarse sin ningún problema cualquier animal usado en un procedimiento de producción de hibridoma conocido. Específicamente, por ejemplo, se puede usar un ratón, una rata, una cabra, vacas, un caballo o similar. Sin embargo, desde el punto de vista de la facilidad de disponibilidad de  
 45 las células de mieloma para fusionarse con las células productoras de anticuerpos extraídas, se usa preferentemente un ratón o una rata como animal a inmunizar.

- Además, la cepa de ratón o de rata que se usará no está particularmente limitada y, en el caso de un ratón, por ejemplo, pueden usarse diversas cepas tales como A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB y 129 y similares, y en el caso de una rata, por ejemplo,  
 50 pueden usarse Wistar, Low, Lewis, Sprague Dawley, ACI, BN, Fischer y similares.

Estos ratones y ratas están disponibles en el mercado de criadores/distribuidores de animales experimentales, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

Entre estos, teniendo en cuenta la compatibilidad de fusión con células de mieloma descritas a continuación, en el caso de un ratón, la cepa BALB/c, y en el caso de una rata, las cepas Wistar y Low se prefieren particularmente como animal a inmunizar.

5 Además, teniendo en cuenta la homología antigénica entre seres humanos y ratones, También se prefiere usar un ratón que tiene función biológica reducida para eliminar autoanticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmunitaria.

La edad de dicho ratón o rata en el momento de la inmunización es, preferentemente, de 5 a 12 semanas de edad, más preferentemente, de 6 a 8 semanas de edad.

10 Con el fin de inmunizar un animal con B7-H3 o un recombinante de la misma, por ejemplo, puede usarse un procedimiento conocido descrito en detalle en, por ejemplo, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) o similares.

Entre todos estos procedimientos de inmunización, un procedimiento específico preferido, tal como se describe en el presente documento es, por ejemplo, de la siguiente manera.

15 Es decir, en primer lugar, una fracción de proteína de membrana que sirve como antígeno o células a las que se hizo expresar el antígeno se administran por vía intradérmica o intraperitoneal a un animal.

20 Sin embargo, se prefiere la combinación de ambas vías de administración para aumentar la eficacia de inmunización y, cuando la administración intradérmica se realiza en la primera mitad y la administración intraperitoneal se realiza en la segunda mitad o solo en la última dosificación, la eficacia de la inmunización puede aumentarse particularmente.

25 El programa de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal a inmunizar, diferencias individuales o similares. Sin embargo, en general, un programa de administración en el que se administra el antígeno de 3 a 6 veces y el intervalo de dosificación es de 2 a 6 semanas, y un programa de administración en el que el número de veces que se administra el antígeno es de 3 a 4 veces y el intervalo de dosificación es de 2 a 4 semanas es más preferido.

Además, La dosis del antígeno varía dependiendo del tipo de animal, diferencias individuales o similares, sin embargo, la dosis se establece, en general, en de 0,05 a 5 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,5 mg.

Se realiza una inmunización de refuerzo de 1 a 6 semanas, preferentemente de 2 a 4 semanas, más preferentemente de 2 a 3 semanas después de la administración del antígeno tal como se ha descrito anteriormente.

30 La dosis del antígeno en el momento de realizar la inmunización de refuerzo varía dependiendo del tipo o tamaño del animal o similar, sin embargo, en el caso de, por ejemplo, un ratón, la dosis generalmente se establece en de 0,05 a 5 mg, preferentemente de 0,1 a 0,5 mg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg.

35 Las células esplénicas o linfocitos que incluyen células productoras de anticuerpos se extirpan asépticamente del animal inmunizado de 1 a 10 días, preferentemente de 2 a 5 días, más preferentemente de 2 a 3 días después de la inmunización de refuerzo. En este momento, se mide el título del anticuerpo y, si se usa un animal que tiene un título de anticuerpos suficientemente aumentado como fuente de suministro de las células productoras de anticuerpos, el procedimiento posterior se puede llevar a cabo de manera más eficiente.

Los ejemplos del procedimiento de medición del título de anticuerpos que se usarán aquí incluyen un procedimiento RIA y un procedimiento ELISA, pero el procedimiento no está limitado a estos.

40 Por ejemplo, si se emplea un procedimiento ELISA, la medición del título de anticuerpos, tal como se describe en el presente documento, puede llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación.

45 En primer lugar, un antígeno purificado o parcialmente purificado se adsorbe a la superficie de una fase sólida tal como una placa de 96 pocillos para ELISA, y la superficie de la fase sólida que no tiene antígeno adsorbido en ella se cubre con una proteína no relacionada con el antígeno tal como albúmina de suero bovino (en lo sucesivo denominada "BSA"). Después de lavar la superficie, ésta se pone en contacto con una muestra diluida sucesivamente (por ejemplo, suero de ratón) como anticuerpo primario para permitir que el anticuerpo en la muestra se una al antígeno.

50 Además, como anticuerpo secundario, se añade un anticuerpo etiquetado con una enzima contra un anticuerpo de ratón y se permite que se una al anticuerpo de ratón. Después del lavado, se añade un sustrato para la enzima y se mide un cambio en la absorbancia que se produce debido al desarrollo del color inducido por la degradación del sustrato o similar y el título del anticuerpo se calcula basándose en la medición.

La separación de las células productoras de anticuerpos de las células esplénicas o linfocitos del animal inmunizado puede llevarse a cabo de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler y col., Nature (1975), 256,

pág. 495; Kohler y col., Eur. J. Immunol. (1977), 6, pág. 511; Milstein y col., Nature (1977), 266, pág. 550; Walsh, Nature (1977), 266, pág. 495). Por ejemplo, en el caso de las células esplénicas, puede emplearse un procedimiento general en el que las células productoras de anticuerpos se separan homogeneizando el bazo para obtener las células mediante filtración con una malla de acero inoxidable y suspendiendo las células en Medio Mínimo Esencial (MEM) de Eagle.

(c) Preparación de células de mieloma (en lo sucesivo denominadas como "mieloma")

Las células de mieloma que se usarán para la fusión celular no están particularmente limitadas y las células adecuadas se pueden seleccionar de líneas celulares conocidas. Sin embargo, teniendo en cuenta la conveniencia cuando un hibridoma se selecciona entre células fusionadas, se prefiere usar una cepa deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se ha establecido.

Más específicamente, los ejemplos de dicha cepa deficiente en HGPRT incluyen X63-Ag8 (X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1 (P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO y BU.1 derivadas de ratones; 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) derivada de ratas; y U266AR(SKO-007), GM1500-GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) y 8226AR/NIP4-1(NP41) derivadas de seres humanos. Estas cepas deficientes en HGPRT están disponibles de, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC) o similar.

Estas cepas celulares se subcultivan en un medio apropiado tal como un medio de 8-azaguanina [un medio obtenido añadiendo 8-azaguanina a un medio RPMI 1640 suplementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina y suero fetal bovino (en lo sucesivo denominado "FBS ")], medio de Dulbecco modificado por Iscove (en lo sucesivo denominado "IMDM "), o medio de Eagle modificado por Dulbecco (en lo sucesivo denominado "DMEM "). En este caso, de 3 a 4 días antes de realizar la fusión celular, las células se subcultivan en un medio normal [por ejemplo, un medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.) que contenía el 10 % de SFB] para garantizar no menos de  $2 \times 10^7$  células el día de la fusión celular.

(d) Fusión celular

La fusión entre las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se puede realizar apropiadamente de acuerdo con un procedimiento conocido (Weir, DM Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), etc.), en condiciones tales que la tasa de supervivencia de las células no se reduzca excesivamente.

Como dicho procedimiento, por ejemplo, puede usarse un procedimiento químico en el que las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclan en una solución que contiene un polímero tal como polietilenglicol a alta concentración, un procedimiento físico que usan estimulación eléctrica, o similar. Entre estos procedimientos, un ejemplo específico del procedimiento químico es tal como se describe a continuación.

Es decir, en el caso en que se usa polietilenglicol en la solución que contiene un polímero a alta concentración, las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclan en una solución de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 1500 a 6000, más preferentemente de 2000 a 4000 a una temperatura de 30 a 40 °C, preferentemente de 35 a 38 °C durante de 1 a 10 minutos, preferentemente de 5 a 8 minutos.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

El procedimiento de selección de hibridomas obtenidos mediante la fusión celular descrita anteriormente no está particularmente limitado. Normalmente, se usa un procedimiento de selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler y col., Nature (1975), 256, pág. 495; Milstein y col., Nature (1977), 266, pág. 550).

Este procedimiento es eficaz cuando se obtienen hibridomas usando células de mieloma de una cepa deficiente en HGPRT que no pueden sobrevivir en presencia de aminopterina.

Es decir, cultivando células no fusionadas e hibridomas en un medio HAT, solo se permite selectivamente sobrevivir y proliferar a los hibridomas resistentes a la aminopterina.

(f) División en clones de una sola célula (clonación)

Como procedimiento de clonación para hibridomas, puede usarse un procedimiento conocido tal como un procedimiento de metilcelulosa, un procedimiento de agarosa suave o un procedimiento de dilución limitante (véase, por ejemplo, Barbara, B. M. y Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Entre estos procedimientos, particularmente, se prefiere un procedimiento de cultivo tridimensional tal como un procedimiento de metilcelulosa. Por ejemplo, el grupo de hibridomas producidos por fusión celular se suspende en un medio de metilcelulosa tal como ClonaCell-HY Selection Medium D (fabricado por StemCell Technologies, Inc., nº 03804) y se cultiva. A continuación, se recogen las colonias de hibridoma formadas, con lo que se pueden obtener hibridomas monoclonales. Las colonias de hibridoma recogidas respectivas



se cultivan, y se selecciona un hibridoma que se ha confirmado que tiene un título de anticuerpo estable en un sobrenadante de cultivo de hibridoma obtenido como una cepa de hibridoma productor de anticuerpo monoclonal B7-H3.

5 Los ejemplos de la cepa de hibridoma establecida de este modo incluyen el hibridoma M30 de B7-H3. Por cierto, en la presente memoria descriptiva, un anticuerpo producido por el hibridoma M30 de B7-H3 se denomina "anticuerpo M30" o simplemente "M30".

10 La cadena pesada del anticuerpo M30 tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 51 en el listado de secuencias. Además, la cadena ligera del anticuerpo M30 tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 53 en el listado de secuencias. Por cierto, en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 51 en el listado de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 141 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 142 a 471 es una región constante. Además, en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 53 en el listado de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 22 es una secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 23 a 130 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 131 a 235 es una región constante.

20 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 51 en el listado de secuencias es codificada por una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 50 en el listado de secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 50 en el listado de secuencias, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena pesada del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 58 a 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 424 a 1413 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

25 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 53 en el listado de secuencias es codificada por una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 52 en el listado de secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 52 en el listado de secuencias, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 66 codifica la secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 67 a 390 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 391 a 705 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.

(g) Preparación del anticuerpo monoclonal mediante cultivo de hibridoma

35 Cultivando el hibridoma seleccionado de este modo, se puede obtener de manera eficiente un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, antes del cultivo, se prefiere realizar el cribado de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal diana.

En dicho cribado, puede emplearse un procedimiento conocido.

La medición del título de anticuerpos, tal como se describe en el presente documento, se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un procedimiento ELISA explicado en el punto (b) descrito anteriormente.

40 El hibridoma obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente se puede almacenar en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un congelador a -80 °C o menos.

Después de la finalización de la clonación, el medio se cambia de un medio HT a un medio normal, y el hibridoma se cultiva.

45 El cultivo a gran escala se lleva a cabo mediante cultivo de rotación usando una botella de cultivo grande o mediante un cultivo giratorio. A partir del sobrenadante obtenido mediante el cultivo a gran escala, se puede obtener un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína, tal como se describe en el presente documento, por purificación usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tales como filtración en gel.

Además, el hibridoma se inyecta en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma (por ejemplo, la BALB/c descrita anteriormente) o un ratón Nu/Nu para proliferar el hibridoma, por lo que se puede obtener la ascitis que contiene una gran cantidad del anticuerpo monoclonal de la invención.

50 En los casos en que el hibridoma se administra a la cavidad abdominal, si se administra un aceite mineral tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristano) de 3 a 7 días antes del mismo, se puede obtener una mayor cantidad de ascitis.

Por ejemplo, un inmunosupresor se inyecta previamente en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma para inactivar los linfocitos T. 20 días después, de  $10^6$  a  $10^7$  células de clones de hibridoma se

suspenden en un medio libre de suero (0,5 ml) y la suspensión se administra a la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen se expande y se llena con la ascitis, la ascitis se recoge del ratón. Mediante este procedimiento, el anticuerpo monoclonal se puede obtener a una concentración que es aproximadamente 100 veces o más mayor que en la solución de cultivo.

- 5 El anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente puede purificarse mediante un procedimiento descrito en, por ejemplo, Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

El anticuerpo monoclonal obtenido de este modo tiene una alta especificidad por el antígeno para B7-H3.

(h) Ensayo de anticuerpo monoclonal

- 10 El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal obtenido de este modo se pueden determinar de la siguiente manera.

En primer lugar, los ejemplos del procedimiento de identificación incluyen un procedimiento de Ouchterlony, un procedimiento ELISA y un procedimiento RIA.

- 15 Un procedimiento de Ouchterlony es sencillo, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, se requiere una operación de condensación.

Por otra parte, cuando se utiliza un procedimiento ELISA o un procedimiento RIA, haciendo reaccionar directamente el sobrenadante del cultivo con una fase sólida adsorbida al antígeno y usando anticuerpos correspondientes a diversos tipos de isotipos y subclases de inmunoglobulinas como anticuerpos secundarios, se pueden identificar el isotipo y la subclase de el anticuerpo monoclonal.

- 20 Además, como un procedimiento más sencillo, también se puede usar un kit de identificación disponible en el mercado (por ejemplo, Mouse Typer Kit fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) o similar.

Además, la determinación cuantitativa de una proteína se puede realizar mediante el procedimiento de Folin Lowry y un procedimiento de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm [ $1,4 \text{ (DO 280) = Inmunoglobulina } 1 \text{ mg / ml}$ ].

- 25 Además, incluso cuando el anticuerpo monoclonal se obtiene por separado e independientemente realizando nuevamente las etapas de (a) a (h) en (2), es posible obtener un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo M30. Como ejemplo de dicho anticuerpo, se puede indicar como ejemplo un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30. El M30 reconoce un epítipo en el dominio IgC1 o IgC2, que es un dominio en el dominio extracelular de B7-H3, y se une al dominio IgC1 o al dominio IgC2 o a ambos. Por lo tanto, como el epítipo para el anticuerpo M30, particularmente, puede indicarse como ejemplo un epítipo presente en el dominio IgC1 o IgC2 de B7-H3. Si un anticuerpo monoclonal recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la que se une el anticuerpo M30, puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30. Además, confirmando que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo M30 por la unión a B7-H3 (es decir, el anticuerpo monoclonal inhibe la unión entre el anticuerpo M30 y B7-H3), se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une a el mismo epítipo que el anticuerpo M30 incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura específica del epítipo. Cuando se confirma que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30, se espera fuertemente que el anticuerpo monoclonal tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo M30.

(3) Otros anticuerpos

- 40 El anticuerpo de la invención incluye no solamente el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente contra B7-H3 sino también un anticuerpo recombinante obtenido mediante modificación artificial con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga en seres humanos, tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden producirse usando procedimientos conocidos.

- 45 Como dicho anticuerpo quimérico, puede indicarse como ejemplo un anticuerpo en el que las regiones variable y constante de anticuerpo se derivan de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en el que una región variable de anticuerpo derivada de ratón o rata se conecta a una región constante derivada de humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 81, 6851-6855, (1984)). Un anticuerpo quimérico derivado de un anticuerpo M30 de ratón anti-B7-H3 humana es un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos consiste en los restos de aminoácidos 20 a 141 de la SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos consiste en los restos de aminoácidos 23 a 130 de la SEQ ID NO: 53, y puede tener una región constante derivada de ser humano arbitraria. Como ejemplo de dicho anticuerpo quimérico, puede indicarse como ejemplo un anticuerpo que consiste en una cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos consiste en los restos de aminoácidos 1 a 471 de la SEQ ID NO: 63 en el listado de secuencias y una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos consiste en los restos de aminoácidos 1 a 233 de la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias. Por
- 55 cierto, en la secuencia de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 63 en el listado de secuencias, la

secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 141 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 142 a 471 es una región constante. Además, en la secuencia de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 20 es una secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 128 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 129 a 233 es una región constante.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 63 en el listado de secuencias es codificada por una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 62 en el listado de secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 62 en el listado de secuencias, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena pesada del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 58 a 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 424 a 1413 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias es codificada por una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 58 en el listado de secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 58 en el listado de secuencias, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 60 codifica la secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 61 a 384 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 385 a 699 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.

Como dicho anticuerpo humanizado, puede indicarse como ejemplo un anticuerpo obtenido integrando solamente una región determinante de complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado de un ser humano (véase Nature (1986) 321, págs. 522-525), y un anticuerpo obtenido injertando una parte de los restos de aminoácidos del marco así como la secuencia de CDR para un anticuerpo humano mediante un procedimiento de injerto de CDR (documento WO 90/07861).

Sin embargo, el anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo M30 no está limitado a un anticuerpo humanizado específico, siempre que el anticuerpo humanizado tenga los 6 tipos de secuencias de CDR del anticuerpo M30 y tenga una actividad antitumoral. Por cierto, la región variable de cadena pesada del anticuerpo M30 tiene CDRH1 (NYVMH) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 92 en el listado de secuencias, CDRH2 (YINPYNDDVKYNEKFKG) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 93, en el listado de secuencias, y CDRH3 (WGYGSPLYFDY) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 94 en el listado de secuencias. Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo M30 tiene CDRL1 (RASSRLIYMH) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 95 en el listado de secuencias, CDRL2 (ATSNLAS) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 96, en el listado de secuencias, y CDRL3 (QQWNSNPPT) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 97 en el listado de secuencias.

Como un ejemplo del anticuerpo humanizado del anticuerpo de ratón M30, puede indicarse como ejemplo una combinación arbitraria de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una cualquiera de (1) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 141 de la SEQ ID NO: 85, 87, 89 o 91 en el listado de secuencias, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % o más con la secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente, y (3) una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente se eliminan, se sustituyen o se añaden y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en cualquiera de (4) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 128 de la SEQ ID NO: 71, 73, 75, 77, 79, 81 u 83 en el listado de secuencias, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % o más con secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente, y (6) una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente se eliminan, se sustituyen o se añaden.

Por cierto, el término "varios", tal como se usa en el presente documento, se refiere a de 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, o 1 o 2.

Como la sustitución de aminoácidos en la presente memoria descriptiva, se prefiere una sustitución conservativa de aminoácidos. La sustitución conservativa de aminoácidos se refiere a una sustitución que se produce dentro de un grupo de aminoácidos relacionados con las cadenas laterales de aminoácidos. Los grupos de aminoácidos preferidos son los siguientes: un grupo ácido (ácido aspártico y ácido glutámico); un grupo básico (lisina, arginina e histidina); un grupo no polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano); y una familia polar no cargada (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina). Grupos de aminoácidos más preferidos son los siguientes: un grupo hidroxil alifático (serina y treonina); un grupo que contiene amida (asparagina y glutamina); un grupo alifático (alanina, valina, leucina e isoleucina); y un grupo aromático (fenilalanina, triptófano y tirosina). Dicha sustitución de aminoácido se realiza preferentemente dentro de un grupo que no altera



aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 83;  
 un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 71;  
 5 un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 73;  
 un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 75; y  
 10 un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 77.

Además, como un anticuerpo que tiene una combinación preferida de una cadena pesada y una cadena ligera descrito anteriormente, un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; y un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 pueden indicarse como ejemplo.

Combinando una secuencia que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada descrita anteriormente con una secuencia que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena ligera descrita anteriormente, es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. Dicha homología es generalmente una homología del 95 % o más, más preferentemente una homología del 99 % o más. Además, combinando una secuencia de aminoácidos en la que uno a varios restos de aminoácidos se sustituyen, eliminan o añaden en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera, también es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente.

La homología entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando parámetros por defecto del algoritmo Blast, versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). El algoritmo Blast también puede usarse a través de internet accediendo al sitio 1334907992153\_0.

Por cierto, en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 85, 87, 89 o 91 en el listado de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 141 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 142 a 471 es una región constante.

Además, en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 71, 73, 75, 77, 79, 81 u 83 en el listado de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 20 es una secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 128 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 129 a 233 es una región constante.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada representadas por la SEQ ID NO: 85, 87, 89 o 91 en el listado de secuencias son codificadas por secuencias de nucleótidos representadas por la SEQ ID NO: 84, 86, 88 o 90, respectivamente, en el listado de secuencias. Además, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 84 y 85

- se muestran en la figura 34, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 86 y 87 se muestran en la figura 35, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 88 y 89 se muestran en la figura 36, y las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 90 y 91 se muestran en la figura 37. En cada una de las secuencias de nucleótidos anteriores, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena pesada del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 58 a 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 424 a 1413 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.
- Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera representadas por la SEQ ID NO: 71, 73, 75, 77, 79, 81 u 83 en el listado de secuencias son codificadas por secuencias de nucleótidos representadas por la SEQ ID NO: 70, 72, 74, 76, 78, 80 u 82, respectivamente, en el listado de secuencias. Además, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 70 y 71 se muestran en la figura 27, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 72 y 73 se muestran en la figura 28, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 74 y 75 se muestran en la figura 29, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 76 y 77 se muestran en la figura 30, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 78 y 79 se muestran en la figura 31, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 80 y 81 se muestran en la figura 32, y las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 82 y 83 se muestran en la figura 33. En cada una de las secuencias de nucleótidos anteriores, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 60 codifica la secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 61 a 384 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 385 a 699 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.
- La homología entre cualquiera de estas secuencias de nucleótidos y una secuencia de nucleótidos de otro anticuerpo también puede determinarse usando el algoritmo Blast.
- Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano que se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30. Un anticuerpo humano anti-B7-H3 se refiere a un anticuerpo humano que tiene solamente una secuencia génica de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano. El anticuerpo humano anti-B7-H3 se puede obtener mediante un procedimiento que usa un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene un fragmento de cromosoma humano que comprende genes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. y col., *Nature Genetics* (1997) 16, págs. 133-143; Kuroiwa, Y. y col., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, págs. 3447-3448; Yoshida, H. y col., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, págs. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. e Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (2000) 97, págs. 722-727, etc.).
- Dicho ratón productor de anticuerpos humanos se puede crear específicamente de la siguiente manera. Un animal genéticamente modificado en el que se han alterado loci génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, y en su lugar, se han introducido loci génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana a través de un vector cromosómico artificial de levadura (YAC) o similar se crea produciendo un animal genomanipulado y un animal transgénico y haciendo aparearse a estos animales.
- Además, de acuerdo con una técnica de ADN recombinante, usando ADNc que codifican cada una de dichas cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo humano, y preferentemente un vector que comprende dichos ADNc, se transforman células eucariotas, y se cultiva una célula transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante, por lo que el anticuerpo también se puede obtener del sobrenadante del cultivo.
- En este caso, como hospedador, por ejemplo, pueden usarse células eucariotas, preferentemente células de mamífero tales como células CHO, linfocitos o células de mieloma.
- Además, También se conoce un procedimiento para obtener un anticuerpo humano derivado de presentación en fagos seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos (véase Wormstone, I. M. y col., *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* (2002) 43 (7), págs. 2301-2308; Carmen, S. y col., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), págs. 189-203; Siriwardena, D. y col., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), págs. 427-431, etc.).
- Por ejemplo, puede usarse un procedimiento de presentación en fagos en el que una región variable de un anticuerpo humano se expresa en la superficie de un fago como un anticuerpo monocatenario (scFv), y se selecciona un fago que se une a un antígeno (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), págs. 1105-1116).
- Analizando el gen del fago seleccionado basándose en su unión a un antígeno, puede determinarse una secuencia de ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humano que se une a un antígeno.
- Si se determina la secuencia de ADN DNA de scFv que se une a un antígeno, puede obtenerse un anticuerpo humano preparando un vector de expresión que comprende la secuencia e introduciendo el vector en un hospedador apropiado para expresarlo (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388, *Annu. Rev. Immunol.* (1994) 12, págs. 433-455, *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), págs. 1105-1116).
- Si un anticuerpo humano recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la que se

5 une el anticuerpo M30, puede determinarse que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30. Además, confirmando que el anticuerpo humano compite con el anticuerpo M30 por la unión a B7-H3 (es decir, el anticuerpo humano inhibe la unión entre el anticuerpo M30 y B7-H3), se puede determinar que el anticuerpo humano se une a el mismo epítipo que el anticuerpo M30 incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura específica del epítipo. Cuando se confirma que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30, se espera fuertemente que el anticuerpo humano tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo M30.

10 Los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos obtenidos mediante los procedimientos descritos anteriormente se evalúan para sus propiedades de unión al antígeno mediante un procedimiento mostrado en el ejemplo 3 o similares, y puede seleccionarse un anticuerpo preferido.

15 Como ejemplo de otro índice para su uso en la comparación de las propiedades de los anticuerpos, se puede indicar como ejemplo la estabilidad de los anticuerpos. Un calorímetro diferencial de barrido (DSC) es un dispositivo capaz de medir de forma rápida y precisa una temperatura de punto medio de desnaturalización térmica (T<sub>m</sub>) que se usará como un índice favorable de la estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Midiendo los valores de T<sub>m</sub> usando un DSC y comparando los mismos, se puede comparar una diferencia en la estabilidad térmica. Se sabe que la estabilidad en almacenamiento de los anticuerpos muestra cierta correlación con la estabilidad térmica de los mismos (Lori Burton, y col., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, págs. 265-273), y se puede seleccionar un anticuerpo preferido usando la estabilidad térmica como índice. Los ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen las siguientes características: el rendimiento en una célula hospedadora apropiada es alto; y la agregabilidad en una solución acuosa es baja. Por ejemplo, un anticuerpo que muestra el rendimiento más alto no siempre muestra la estabilidad térmica más alta y, por lo tanto, es necesario seleccionar el anticuerpo más adecuado para la administración a seres humanos realizando una evaluación exhaustiva basada en los índices descritos anteriormente.

25 Además, también se conoce un procedimiento en el que las secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa de un anticuerpo se conectan usando un enlazador apropiado, por lo que se obtiene una inmunoglobulina monocatenaria (Lee, HS, y col., *Molecular Immunology* (1999). ) 36, págs. 61-71; Shirmann, T. y col., *MAbs* (2010), 2, (1) págs. 1-4). Dimerizando dicha inmunoglobulina monocatenaria, el dímero resultante puede tener una estructura y una actividad similares a las de un anticuerpo que es un tetrámero en sí mismo. Además, el anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo que tiene una sola región variable de cadena pesada y no tiene una secuencia de cadena ligera. Dicho anticuerpo se denomina anticuerpo de dominio único (sdAb) o un nanocuerpo, y de hecho, dicho anticuerpo se observa en camellos y llamas y se ha notificado que tiene una afinidad de unión a antígeno (Muyldeans S. y col., *Protein Eng.* (1994) 7 (9), 1129-35, Hamers-Casterman C. y col., *Nature* (1993) 363 (6428) 446-8). Los anticuerpos descritos anteriormente también pueden interpretarse como un tipo de fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la invención.

35 En la invención, también se incluye una variante modificada del anticuerpo o un fragmento funcional del mismo. La variante modificada se refiere a una variante obtenida sometiendo al anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de la invención a una modificación química o biológica. Los ejemplos de dicha variante químicamente modificada incluyen variantes químicamente modificadas enlazando un resto químico a una cadena principal de aminoácido, variantes químicamente modificadas con una cadena de carbohidrato enlazada a O o enlazada a O, etc. Los ejemplos de dicha variante biológicamente modificada incluyen variantes obtenidas por modificación después de la traducción (como glucosilación enlazada a N o enlazada a O, procesamiento N- o C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico u oxidación de metionina), y variantes en las que se ha añadido un resto de metionina al extremo N al expresarse en una célula hospedadora procarionota.

45 Además, un anticuerpo etiquetado para permitir la detección o el aislamiento del anticuerpo de la invención o un antígeno, tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo etiquetado con una enzima, un anticuerpo etiquetado con fluorescencia y un anticuerpo etiquetado por afinidad también están incluidos en el significado de la variante modificada. Dicha variante modificada del anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de la invención es útil para mejorar la estabilidad y la retención sanguínea del anticuerpo original o un fragmento funcional del anticuerpo de la invención, reduciendo la antigenicidad del mismo, detectando o aislando dicho anticuerpo o un antígeno, y así sucesivamente.

55 Además, regulando la modificación de un glicano que está enlazado al anticuerpo de la invención (glucosilación, defucosilación, etc.), es posible potenciar la actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. Como la técnica para regular la modificación de un glicano de anticuerpos, WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, etc., desvelan técnicas conocidas. Sin embargo, la técnica procedimiento no está limitada a estas. En el anticuerpo y el fragmento funcional del anticuerpo de la invención, también está incluido un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo en el que la modificación de un glicano está regulada.

60 En los casos en que se produce un anticuerpo aislando en primer lugar un gen de anticuerpo e introduciendo, a continuación, el gen en un hospedador apropiado, se puede usar una combinación de un hospedador apropiado y un vector de expresión apropiado. Los ejemplos específicos del gen de anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo y un gen que codifica una secuencia de cadena

ligera del mismo descrito en la presente memoria descriptiva. Cuando se transforma una célula hospedadora, es posible insertar el gen de la secuencia de cadena pesada y el gen de la secuencia de cadena ligera en el mismo vector de expresión, y también en diferentes vectores de expresión por separado.

5 En los casos en que se usan células eucariotas como hospedador, pueden usarse células animales, células vegetales y microorganismos eucariotas. Como dichas células animales, pueden indicarse como ejemplo células de mamífero, por ejemplo, células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC n.º CRL-1658), y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, LA, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. (1980) 77, págs. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61).

10 En los casos en que se usan células procariotas, por ejemplo, pueden indicarse como ejemplo *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

15 Introduciendo un gen de un anticuerpo deseado o un fragmento funcional del anticuerpo en estas células mediante transformación, y cultivando las células transformadas de este modo *in vitro*, se puede obtener el anticuerpo. En el procedimiento de cultivo descrito anteriormente, el rendimiento puede, algunas veces, variar dependiendo de la secuencia del anticuerpo y, por lo tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que se produzca fácilmente como un producto farmacéutico usando el rendimiento como índice entre los anticuerpos que tienen una actividad de unión equivalente. Por lo tanto, en el anticuerpo y el fragmento funcional del anticuerpo de la invención, un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo obtenido mediante un procedimiento de producción de un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, caracterizado por incluir una etapa de cultivar la célula hospedadora transformada y una etapa de recoger un anticuerpo deseado o un fragmento funcional del anticuerpo a partir de un producto cultivado obtenido en la etapa de cultivo también está incluido.

20 Por cierto, se sabe que se elimina un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), y también se sabe que se eliminan dos restos de aminoácidos (glicina y lisina) en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada y se amida un resto de prolina recién localizado en el extremo carboxilo (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, dicha eliminación y modificación de la secuencia de cadena pesada no afecta la afinidad de unión al antígeno y la función efectora (la activación del complemento, la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, etc.) del anticuerpo. Por lo tanto, en la invención, también se incluyen un anticuerpo y un fragmento funcional del anticuerpo sometido a dicha modificación, y una variante de eliminación en la que se han eliminado uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada, una variante obtenida por la amidación de la variante de eliminación (por ejemplo, una cadena pesada en la que se ha amidado el resto de prolina carboxilo terminal) y similares se pueden indicar como ejemplo. El tipo de variante de eliminación que tiene una eliminación en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la invención no se limita a las variantes anteriores siempre que se conserven la afinidad de unión al antígeno y la función efectora. Las dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la invención pueden ser de un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en una cadena pesada de longitud completa y la variante de eliminación descrita anteriormente, o pueden ser de dos tipos en combinación seleccionados a partir del mismo. La relación de la cantidad de cada variante de eliminación puede verse afectada por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la invención y las condiciones de cultivo, sin embargo, un caso en el que un resto de aminoácido en el extremo carboxilo se ha eliminado en ambos de las dos cadenas pesadas contenidas como componentes principales en el anticuerpo de acuerdo con la invención se puede indicar como ejemplo. No hay limitación en el isotipo del anticuerpo de la invención, y sus ejemplos incluyen IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD e IgE, y los ejemplos preferidos de los mismos incluyen IgG e IgM, y otros ejemplos más preferidos de los mismos incluyen IgG1 e IgG2.

45 Además, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento funcional del anticuerpo que tiene un sitio de unión a antígeno del anticuerpo o un fragmento modificado del mismo. El fragmento del anticuerpo puede obtenerse tratando el anticuerpo con una proteasa tal como papaína o pepsina, o modificando el gen del anticuerpo de acuerdo con una técnica de ingeniería genética y expresando el gen modificado en células cultivadas adecuadas. Entre estos fragmentos de anticuerpo, un fragmento que tiene todas o parte de las funciones del anticuerpo se puede denominar fragmento funcional del anticuerpo, siempre que tenga las siguientes funciones de:

- 50 (a) unirse específicamente a B7-H3, en el que B7-H3 es una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 o 10, y el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo se une a un polipéptido que consiste en IgC2, en el que IgC2 es un dominio de B7-H3;
- 55 (b) tener una actividad de fagocitosis mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCP);
- (c) tener una actividad antitumoral *in vivo*, y
- (d) tener una actividad inhibidora competitiva contra el anticuerpo M30 para la unión a B7-H3, en el que el anticuerpo M30 comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos 23 a 235 de la SEQ ID NO: 53.

60 Como las funciones del anticuerpo, generalmente actividad de unión a antígeno, una actividad de neutralización de



la actividad de un antígeno, una actividad de potenciación de la actividad de un antígeno, actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) pueden indicarse como ejemplo. Como quedará claro a partir de lo anterior, la función del anticuerpo y el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la invención es una actividad de unión específica a B7-H3, en el que B7-H3 es una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 o 10, y el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo se une a un polipéptido que consiste en IgC2, en el que IgC2 es un dominio de B7-H3, actividad de fagocitosis mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCP), actividad antitumoral in vivo, y actividad inhibidora competitiva contra el anticuerpo M30 para la unión a B7-H3, en el que el anticuerpo M30 comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos 23 a 235 de la SEQ ID NO: 53. Se prefiere que la actividad citotóxica (actividad antitumoral) esté mediada por una actividad ADCP contra células tumorales. Además, el anticuerpo de la invención puede tener actividad ADCC y/o actividad CDC además de actividad ADCP. En particular, se ha notificado que un producto farmacéutico que contiene un anticuerpo antitumoral disponible actualmente actúa directamente sobre las células tumorales para bloquear una señal proliferativa, actúa directamente sobre las células tumorales para inducir una señal de muerte celular, suprime la angiogénesis, induce actividad ADCC mediada por células NK, e induce actividad CDC mediada por el complemento, suprimiendo de este modo el crecimiento de las células tumorales (J Clin Oncol 28: 4390-4399. (2010), Clin Cancer Res; 16 (1); 11-20. (2010)), sin embargo, al menos los inventores de la presente invención no son conscientes de que la actividad ADCP del anticuerpo anti-B7-H3 de acuerdo con la invención de la presente solicitud ha sido notificada como la actividad de un producto farmacéutico que contiene un anticuerpo antitumoral disponible actualmente.

Los ejemplos del fragmento del anticuerpo incluyen Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fv monocatenario (scFv) en el que las moléculas de Fv de la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas a través de un enlazador apropiado, un diacuerpo (diacuerpos), un anticuerpo lineal y un anticuerpo poliespecífico compuesto por el fragmento de anticuerpo. Además, Fab 'que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenido tratando F(ab')<sub>2</sub> en condiciones reductoras también está incluido en el fragmento del anticuerpo.

Además, el anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo poliespecífico con especificidad para al menos dos tipos diferentes de antígenos. En general, dicho anticuerpo se une a dos tipos de antígenos (es decir, un anticuerpo biespecífico), sin embargo, el "anticuerpo poliespecífico", tal como se usa en el presente documento, incluye un anticuerpo que tiene especificidad por dos o más (por ejemplo, tres) tipos de antígenos.

El anticuerpo poliespecífico de la invención puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de dicho anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico F(ab')<sub>2</sub>). El anticuerpo biespecífico puede producirse conectando las cadenas pesada y ligera (pares de HL) de dos tipos de anticuerpos, o también puede producirse fusionando hibridomas que producen diferentes anticuerpos monoclonales para preparar células fusionadas productoras de anticuerpos biespecíficos (Millstein y col. Nature (1983) 305, págs. 537-539).

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monocatenario (también denominado scFv). El anticuerpo monocatenario se puede obtener conectando la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo a través de un enlazador polipeptídico (Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113 (editado por Rosenberg y Moore), Springer Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994), Nature Biotechnology (2005), 23, págs. 1126-1136). Además, un fragmento BiscFv producido conectando dos moléculas de scFv a través de un enlazador polipeptídico también se puede usar como el anticuerpo biespecífico.

En este campo técnico se conoce un procedimiento para producir un anticuerpo monocatenario (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 4.946.778, 5.260.203, 5.091.513, 5.455.030, etc.). En este scFv, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están conectadas mediante un enlazador que no forma un conjugado, preferentemente a través de un enlazador polipeptídico (Huston, J. S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. (1988), 85, págs. 5879-5883). En el scFv, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera pueden derivarse del mismo anticuerpo o de diferentes anticuerpos.

Como el enlazador polipeptídico que se usará para conectar las regiones variables, por ejemplo, se usa un péptido monocatenario dado que consiste en de 12 a 19 restos.

Se puede obtener un ADN que codifica un scFv realizando la amplificación mediante PCR usando un ADN como molde que comprende la totalidad o una parte deseada de un ADN seleccionado entre un ADN que codifica la cadena pesada o la región variable de cadena pesada del anticuerpo descrito anteriormente y ADN que codifica la cadena ligera o la región variable de cadena ligera del mismo y también usando un par de cebadores que define ambos extremos del ADN modelo y realizando además amplificación mediante combinando un ADN que codifica una parte de enlazador polipeptídico y un par de cebadores que define ambos extremos del polipéptido para conectar ambos extremos del mismo a cada una de las cadenas pesada y ligera.

Además, una vez que se produce el ADN que codifica un scFv, se puede obtener un vector de expresión que comprende el mismo y un hospedador transformado por el vector de expresión de acuerdo con procedimientos comunes. Además, usando el hospedador resultante, se puede obtener un scFv de acuerdo con procedimientos

comunes. Un fragmento de anticuerpo del mismo puede producirse en un hospedador obteniendo un gen y expresando el gen de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

5 El anticuerpo de la invención puede multimerizarse para aumentar su afinidad por un antígeno. El anticuerpo a multimerizar puede ser un tipo de anticuerpo o varios anticuerpos que reconocen varios epítomos del mismo antígeno. Como un procedimiento de multimerización del anticuerpo, se puede indicar como ejemplo la unión del dominio IgG CH3 a dos moléculas scFv, la unión a estreptavidina, la introducción de un motivo hélice-giro-hélice y similares.

10 El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo policlonal que es una mezcla de varios tipos de anticuerpos anti-B7-H3 que tienen diferentes secuencias de aminoácidos. Como ejemplo del anticuerpo policlonal, se puede indicar como ejemplo una mezcla de varios tipos de anticuerpos que tienen diferentes CDR. Como dicho anticuerpo policlonal, pueden usarse anticuerpos obtenidos cultivando una mezcla de células que producen anticuerpos diferentes y purificando a continuación los anticuerpos a partir del cultivo resultante (véase el documento WO 2004/061104).

15 Como anticuerpo modificado, también puede usarse un anticuerpo unido a cualquiera de diversos tipos de moléculas tales como polietilenglicol (PEG).

20 Además, el anticuerpo de la invención puede estar en forma de un conjugado formado entre cualquiera de estos anticuerpos y otro agente medicinal (inmunconjugado). Los ejemplos de dicho anticuerpo incluyen un conjugado en el que el anticuerpo se conjuga con un material radioactivo o un compuesto que tiene una acción farmacológica (Nature Biotechnology (2005) 23, págs. 1137-1146). Los ejemplos de los mismos incluyen indio (<sup>111</sup>In)-capromab pendétido, tecnecio (<sup>99m</sup>Tc)-nofetumomab merpentan, indio (<sup>111</sup>In)-ibritumomab, itrio (<sup>90</sup>Y)-ibritumomab y yodo (<sup>131</sup>I)-tositumomab.

25 El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo pueden realizarse empleando un procedimiento convencional de separación y purificación de proteínas. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse seleccionando y combinando adecuadamente cromatografía en columna, filtración en filtro, ultrafiltración, precipitación con sales, diálisis, electroforesis en gel de poli(acrilamida) preparativa, electroforesis de enfoque isoeléctrico y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero el procedimiento no está limitado a estos.

30 Los ejemplos de dicha cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción.

Dicha cromatografía puede realizarse empleando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

35 Como columna para usar en cromatografía de afinidad, se pueden indicar como ejemplo una columna de Proteína A y una columna de Proteína G. Por ejemplo, como columna que usa una columna de Proteína A, pueden indicarse como ejemplo Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) y similares.

Además, usando un vehículo que tiene un antígeno inmovilizado sobre él, el anticuerpo también puede purificarse usando la propiedad de unión del anticuerpo al antígeno.

### 3. Producto farmacéutico que comprende anticuerpo anti-B7-H3

40 Los anticuerpos obtenidos mediante el procedimiento descrito en el punto anterior "2. Producción del anticuerpo anti-B7-H3" exhiben una actividad citotóxica contra células cancerosas y, por lo tanto, pueden usarse como un producto farmacéutico, particularmente un agente terapéutico y/o agente preventivo para el cáncer.

La actividad citotóxica exhibida por un anticuerpo in vitro puede determinarse midiendo la actividad inhibidora del crecimiento celular.

45 Por ejemplo, se cultiva una línea celular cancerosa que sobreexpresa B7-H3, se añade un anticuerpo al sistema de cultivo a diferentes concentraciones, y se puede medir cualquier actividad inhibidora contra la formación de focos, la formación de colonias y el crecimiento de esferoides.

50 El efecto terapéutico in vivo de un anticuerpo sobre el cáncer usando animales experimentales puede determinarse, por ejemplo, administrando el anticuerpo a ratones desnudos a los que se les implanta una línea celular tumoral que sobreexpresa B7-H3 y midiendo cualquier cambio en las células cancerosas.

Los ejemplos del tipo de cáncer incluyen cáncer de pulmón, cáncer de riñón, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, un melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago y cáncer de esófago, sin embargo, el tipo de cáncer no está limitado a estos, siempre que la célula cancerosa a tratar exprese B7-H3.

Una sustancia aceptable a usar en la preparación de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es, preferentemente, no tóxica para un individuo al que se le va a administrar la composición farmacéutica en términos de dosis y concentración.

5 La composición farmacéutica de la invención puede comprender una sustancia para uso farmacéutico que es capaz de cambiar o mantener el pH, la presión osmótica, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, la condición aséptica, la estabilidad, la solubilidad, la velocidad de liberación, la velocidad de absorción y la permeabilidad de la misma. Los ejemplos de dicha sustancia para uso farmacéutico incluyen, aunque sin limitación, aminoácidos, tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, arginina y lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, sulfato de sodio e hidrogenosulfito de sodio; tampones tales como tampones fosfato, citrato, borato, hidrogenocarbonato de sodio y soluciones de Tris-HCl; materiales de relleno tales como manitol y glicina; agentes quelantes tales como tetraacetato de etilendiamina (EDTA); agentes complejantes tales como cafeína, polivinilpirrolidina,  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; expansores tales como glucosa, manosa y dextrina; otros carbohidratos tales como monosacáridos y disacáridos; agentes colorantes; aromas; diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidina; conservantes tales como polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sales, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenilico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno; disolventes tales como glicerina, propilenglicol y polietilenglicol; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; agentes de suspensión; tensioactivos tales como éster de sorbitán, polisorbatos incluyendo polisorbato 20 y polisorbato 80, Triton, trometamina, lecitina y colestero; agentes potenciadores de la estabilidad tales como sacarosa y sorbitol; agentes potenciadores de la elasticidad tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y manitol y sorbitol; agentes de transporte; excipientes; y/o adyuvantes farmacéuticos. La cantidad de estas sustancias para uso farmacéutico es, preferentemente, de 0,001 a 100 veces, de forma particularmente preferente de 0,1 a 10 veces el peso del anticuerpo anti-B7-H3. Los expertos en la materia pueden determinar apropiadamente una formulación preferida de la composición farmacéutica en una preparación dependiendo de la enfermedad a la que se aplica la composición, la vía de administración a aplicar, o similares.

El excipiente o vehículo en la composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido o un sólido. Un excipiente o vehículo apropiado puede ser agua inyectable, solución salina fisiológica, un líquido cefalorraquídeo artificial u otra sustancia usada comúnmente para administración parenteral. Además, también puede usarse como vehículo una solución salina fisiológica neutra o solución salina fisiológica que contiene albúmina de suero. La composición farmacéutica puede contener un tampón Tris de pH 7,0 a 8,5, un tampón de acetato de pH 4,0 a 5,5 o un tampón de citrato de pH 3,0 a 6,2. Además, dicho tampón puede complementarse con sorbitol u otro compuesto.

Los ejemplos de la composición farmacéutica de la invención incluyen una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H3 y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H3 y al menos un agente terapéutico para el cáncer. La composición farmacéutica de la invención se prepara en forma de un producto liofilizado o un líquido como un agente medicinal que tiene una composición seleccionada y una pureza requerida. La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H3 y la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H3 y al menos un agente terapéutico contra el cáncer también pueden formarse en un producto liofilizado usando un excipiente apropiado, tal como sacarosa.

En la composición farmacéutica descrita anteriormente, el agente terapéutico para el cáncer a incorporar junto con el anticuerpo anti-B7-H3 se puede administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente con el anticuerpo anti-B7-H3, o el agente terapéutico y el anticuerpo anti-B7-H3 se pueden administrar a diferentes intervalos de dosificación. Los ejemplos de dicho agente terapéutico para el cáncer incluyen abraxane, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, irinotecán (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina y agentes medicinales descritos en el documento WO 2003/038043, y ejemplos adicionales de los mismos incluyen análogos de LH-RH (tales como leuprorelina y goserelina), fosfato de estramustina, antagonistas de estrógenos (tales como tamoxifeno y raloxifeno) e inhibidores de aromataza (tales como anastrozol, letrozol y exemestano), sin embargo, el agente no está limitado a estos siempre que el agente sea un agente medicinal que tenga una actividad antitumoral.

Un individuo al que se le va a administrar la composición farmacéutica no está particularmente limitado, sin embargo, son preferidos los mamíferos, y son más preferidos los seres humanos.

50 La composición farmacéutica de la invención puede prepararse para administración parenteral o para absorción gastrointestinal a través de administración oral. La composición y la concentración de una preparación pueden determinarse dependiendo del procedimiento de administración. Cuanto mayor sea la afinidad del anticuerpo anti-B7-H3 comprendido en la composición farmacéutica de la invención por B7-H3, es decir, cuanto menor sea la constante de disociación (valor Kd) del mismo por B7-H3, más puede exhibir el anticuerpo anti-B7-H3 su eficacia farmacológica incluso cuando disminuye la dosis para seres humanos. Por lo tanto, la dosis de la composición farmacéutica de la invención para seres humanos también puede determinarse basándose en este resultado. En cuanto a la dosis, en el caso en que un anticuerpo humano anti-B7-H3 se administra a seres humanos, el anticuerpo puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg una o varias veces a intervalos de 1 a 180 días. Los ejemplos de la forma de dosificación de la composición farmacéutica de la invención incluyen inyecciones que incluyen infusiones, supositorios, agentes transnasales, agentes sublinguales y absorbentes percutáneos.

En lo sucesivo en el presente documento, la invención se describirá más específicamente con referencia a los ejemplos, sin embargo, la invención no está limitada a los mismos.

### Ejemplos

- 5 Nótese que las operaciones respectivas respecto a la genomanipulación en los siguientes ejemplos se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en "Molecular Cloning" (redactado por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press en 1989), o en el caso de usar reactivos o kits disponibles en el mercado, estos se usan de acuerdo con las instrucciones adjuntas a ellos, a menos que se indique lo contrario.

#### Ejemplo 1. Producción del plásmido

- 10 1)-1 Producción del vector de expresión de B7-H3 humana

1)-1-1 Producción del vector de expresión para la variante 1 de B7-H3 humana de longitud completa

Se realizó una reacción de PCR usando un ADNc sintetizado a partir del ARN total de células LNCaP (American Type Culture Collection (ATCC)) como modelo y también usando el siguiente conjunto de cebadores, amplificando de este modo un ADNc que codifica la variante 1 de B7-H3 humana:

- 15 Cebador 1:

5'-ctatagggagaccaagctggctagcatgctgctcgccggggcag-3' (SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias); y

Cebador 2:

5'-aacgggccctctagactcgagcggccgctcaggctatttctgtccatcatcttc ttgctgtcag-3' (SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias).

- 20 Posteriormente, el producto de PCR obtenido de este modo se purificó usando MagExtractor PCR & Gel cleanup (TOYOBO, Co., Ltd.). A continuación, el producto de PCR se digirió con enzimas de restricción (NheI y NotI), seguida por purificación usando MagExtractor PCR & Gel cleanup (TOYOBO, Co., Ltd.). Un ADN plasmídico pcDNA3.1(+) se digirió con las mismas enzimas de restricción (NheI y NotI), seguida por purificación usando MagExtractor PCR & Gel cleanup (TOYOBO, Co., Ltd.).

- 25 Las soluciones de ADN purificadas resultantes se mezclaron, y además, se les añadió Ligation high (TOYOBO, Co., Ltd.), y la mezcla resultante se incubó a 16 °C durante 8 horas para efectuar el ligamiento. La mezcla de reacción resultante se añadió a células DH5α competentes de E. coli (Invitrogen Corporation) para efectuar la transformación.

Se realizó PCR directa de colonias en las colonias resultantes usando los cebadores de PCR y el cebador inverso de BGH, y se seleccionó un clon candidato.

- 30 El clon candidato obtenido se cultivó en un medio líquido (LB/Amp), y se extrajo un ADN plasmídico usando MagExtractor -Plasmid- (TOYOBO, Co., Ltd.).

Usando el ADN plasmídico obtenido como modelo, se determinó una secuencia entre los siguientes Cebador 3 y Cebador 4 mediante análisis de secuencia y las secuencias se compararon entre el clon obtenido y la secuencia CDS proporcionada:

- 35 Cebador 3 (cebador promotor de CMV):

5'-cgcaaatgggcggtaggcgtg-3' (SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias); y

Cebador 4 (cebador inverso de BGH):

5'-tagaaggcacagtcgagg-3' (SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias).

- 40 Después de confirmar la secuencia, el clon obtenido se cultivó en 200 ml de medio LB/Amp, y se extrajo un ADN plasmídico usando el kit Plasmid Midi V-100 (VioGene, Inc.).

El vector obtenido de este modo se denominó "pcDNA3.1-B7-H3". La secuencia de la región ORF del gen de la variante 1 de B7-H3 clonado en este vector se representa mediante los números de nucleótidos 1 a 1602 en la SEQ ID NO: 5 en el listado de secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la variante 1 de B7-H3 se representa mediante la SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias.

- 45 1)-1-2 Producción del vector de expresión para la variante 2 de B7-H3 humana de longitud completa

Se realizó PCR usando un ADNc sintetizado a partir del ARN total de células LNCaP como modelo y también usando el siguiente conjunto de cebadores, amplificando de este modo un ADNc que codifica la variante 2 de B7-H3

humana:

Cebador 5

5'-ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcaccatgctgctcgcgggggcagc cctg-3' (SEQ ID NO: 7 en el listado de secuencias)

5 Cebador 6

5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgctatttctgt-3' (SEQ ID NO: 8 en el listado de secuencias).

La purificación se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1)-1-1, y el producto de PCR después de la purificación se integró en un vector pDONR221 (Invitrogen Corporation) mediante una reacción BP con el sistema Gateway, transformando de este modo TOP10 de E. coli (Invitrogen Corporation).

10 Para los clones obtenidos después de la transformación, el tamaño del inserto se confirmó por PCR de colonias. Para 8 clones en los que se confirmó el tamaño del inserto, la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto se confirmó realizando una reacción de secuenciación desde el lado del vector al lado del inserto para ambos extremos. Se realizó una reacción LR con el sistema Gateway entre el clon de entrada cuya secuencia se confirmó y un vector de destino Gateway pcDNA-DEST40 (Invitrogen Corporation). Para el clon obtenido después de la  
15 transformación de TOP10 de E. coli, el tamaño del inserto se confirmó por PCR de colonias. Para el clon en el que se confirmó el tamaño del inserto, se analizó la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto para confirmar que el inserto de interés se insertó correctamente. Al menos 1 mg del plásmido del clon producido de este modo se purificó usando el kit PureLink HiPure Plasmid Megaprep (Invitrogen Corporation).

20 El vector obtenido de este modo se denominó "pcDNA-DEST40-B7-H3 variante 2". La secuencia de la región ORF del gen de la variante 2 de B7-H3 clonado en este vector se representa mediante los números de nucleótidos 1 a 948 en la SEQ ID NO: 9 en el listado de secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la variante 2 de B7-H3 se representa mediante la SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias.

1)-2 Producción del vector de expresión para la proteína parcial B7-H3

25 Usando el plásmido de B7-H3 de longitud completa relacionado con la variante 1 de B7-H3 del ejemplo 1)-1-1 como molde, cada una de las siguientes regiones se amplificó por PCR. Los números que muestran cada región de interés corresponden a los números de nucleótidos de B7-H3 representados por la SEQ ID NO: 5. El cebador se diseñó para contener un codón de terminación en el extremo 3' además de la secuencia de att de Gateway.

30 Cada una de las siguientes regiones 1), 2) y 3) se preparó amplificando dos regiones y ligando a continuación las regiones mediante PCR para formar un fragmento. Es decir, en cuanto a la región 1), la amplificación se realizó usando los cebadores 7 y 12, y los cebadores 15 y 11, y los productos de PCR resultantes se amplificaron adicionalmente usando los cebadores 7 y 11. En cuanto a la región 2), la amplificación se realizó usando los  
35 cebadores 8 y 13, y los cebadores 15 y 11, y los productos de PCR resultantes se amplificaron adicionalmente usando los cebadores 8 y 11. En cuanto a la región 3), la amplificación se realizó usando los cebadores 9 y 14, y los cebadores 15 y 11, y los productos de PCR resultantes se amplificaron adicionalmente usando los cebadores 9 y 11. En cuanto a la región 4), la amplificación se realizó usando los cebadores 10 y 11. En cuanto a la región 5), la amplificación se realizó usando los cebadores 8 y 11. En cuanto a la región 6), la amplificación se realizó usando los cebadores 9 y 11.

Regiones de interés

- 40 1) ORF de la variante 1 de B7-H3: 79-417 y 1369-1602 (573 pb)  
2) ORF de la variante 1 de B7-H3: 418-732 y 1369-1602 (549 pb)  
3) ORF de la variante 1 de B7-H3: 733-1071 y 1369-1602 (573 pb)  
4) ORF de la variante 1 de B7-H3: 1072-1602 (531 pb)  
5) ORF de la variante 1 de B7-H3: 418-1602 (1185 pb)  
6) ORF de la variante 1 de B7-H3: 733-1602 (870 pb)

45 Número de cebador y secuencia de bases

Cebador 7

5'-ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcggagccctggaggtccaggtc-3' (SEQ ID NO: 11 en el listado de secuencias)

Cebador 8

50 5'-ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcgctccctactcgaagcccagcatg -3' (SEQ ID NO: 12 en el listado de secuencias)

Cebador 9

5'-ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcggagccgtggaggtccaggtc-3' (SEQ ID NO: 13 en el listado de secuencias)

Cebador 10

5'-ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcgctccctactcgaagcccagcatg-3' (SEQ ID NO: 14 en el listado de secuencias)

Cebador 11

- 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcaggctatttctgtccatcatc-3' (SEQ ID NO: 15 en el listado de secuencias)  
Cebador 12  
5'-gggaatgcataggtgctcccggccacctgcaggctgacggcag-3' (SEQ ID NO: 16 en el listado de secuencias)  
Cebador 13
- 5 5'-gggaatgcataggtgctcccgtgtgggcttctctgtgggtg-3' (SEQ ID NO: 17 en el listado de secuencias)  
Cebador 14  
5'-gggaatgcataggtgctcccggccacctgcaggctgacggcag-3' (SEQ ID NO: 18 en el listado de secuencias)  
Cebador 15  
5'-gggcagcctatgacattccccccagag-3' (SEQ ID NO: 19 en el listado de secuencias)
- 10 La purificación se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1)-1-1, y cada uno de los productos amplificados después de la purificación se integró en un vector pDONR221 mediante una reacción BP con el sistema Gateway, transformando de este modo TOP10 de *E. coli*. Para los clones obtenidos después de la transformación, el tamaño del inserto se confirmó por PCR de colonias.
- 15 Para cada uno de los clones en los que el tamaño del inserto se confirmó, la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto se confirmó realizando una reacción de secuenciación desde el lado del vector al lado del inserto para ambos extremos.
- Para los clones que se confirmó que tenían el inserto de interés, la secuencia de ADN total del inserto también se confirmó usando los siguientes cebadores. Como resultado del análisis de la secuencia, se confirmó que todas las secuencias eran completamente idénticas a la información de las secuencias de interés.
- 20 Se realizó una reacción LR con el sistema Gateway entre cada uno de los clones de entrada cuya secuencia se confirmó y pFLAG-myc-CMV-19-DEST (Invitrogen Corporation). Para los clones obtenidos después de la transformación de DH10B de *E. coli* (Invitrogen Corporation), el tamaño del inserto se confirmó por PCR de colonias.
- 25 Para cada uno de los clones en los que el tamaño del inserto se confirmó, se analizó la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto para confirmar que el inserto de interés se insertó correctamente. En lo sucesivo en el presente documento, los vectores de expresión obtenidos integrando cada una de las regiones 1) a 6) anteriores se representaron mediante "B7-H3 IgV1", "B7-H3 IgC1", "B7-H3 IgV2", "B7-H3 IgC2", "B7-H3 IgC1-V2-C2" y "B7-H3 IgV2-C2", respectivamente.
- 30 Las secuencias de nucleótidos de las regiones ORF de los genes de B7-H3 IgV1, B7-H3 IgC1, B7-H3 IgV2, B7-H3 IgC2, B7-H3 IgC1-V2-C2 y B7-H3 IgV2-C2, cada una de las cuales se clonó en este vector, se representan mediante las SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28 y 30, respectivamente, en el listado de secuencias. Además, las secuencias de aminoácidos de los B7-H3 IgV1, B7-H3 IgC1, B7-H3 IgV2, B7-H3 IgC2, B7-H3 IgC1-V2-C2 y B7-H3 IgV2-C2 se representan mediante las SEQ ID NO: 21, 23, 25, 27, 29 y 31, respectivamente, en el listado de secuencias.
- 35 Además, las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 20 y 21 se muestran en la figura 15, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 22 y 23 se muestran en la figura 16, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 24 y 25 se muestran en la figura 17, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 26 y 27 se muestran en la figura 18, Las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 28 y 29 se muestran en la figura 19, y las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 30 y 31 se muestran en la figura 20.
- 1)-3 Producción de vectores de expresión para genes de la familia B7
- 40 pCMV6-XL-4-B7RP-1, pCMV6-XL-4-B7-H1 y pCMV6-XL-4-B7-DC (que son vectores de expresión génica obtenidos integrando cada uno de B7RP-1, B7-H1 y B7-DC (que son genes de la familia B7) en un vector de expresión pCMV6-XL-4) se adquirieron todos de OriGene, Inc.
- Los vectores que expresan cada uno de CD80, CD86 y B7-H4, que son genes de la familia B7, se produjeron de la siguiente manera.
- 45 pENTR/221-CD80, pENTR/221-CD86 y pENTR/221-B7-H4, que son clones obtenidos integrando cada uno de CD80, CD86 y B7-H4 en un vector de entrada pENTR/221, se adquirieron de Invitrogen Corporation
- 50 Se realizó una reacción LR con el sistema Gateway entre cada uno de los clones de entrada cuya secuencia se confirmó y pcDNA3.1-DEST (Invitrogen Corporation). Para los clones obtenidos después de la transformación de DH10B de *E. coli*, el tamaño del inserto se confirmó por PCR de colonias. Para cada uno de los clones en los que el tamaño del inserto se confirmó, se analizó la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto para confirmar que el inserto de interés se insertó correctamente.
- 55 Las secuencias de nucleótidos de las regiones ORF de los genes B7RP-1, B7-H1, B7-DC, CD80, CD86 y B7-H4, cada una de las cuales se clonó en este vector, se representan mediante las SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40 y 42, respectivamente, en el listado de secuencias. Además, las secuencias de aminoácidos de los B7RP-1, B7-H1, B7-DC, CD80, CD86 y B7-H4 se representan por las SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41 y 43, respectivamente, en el listado de secuencias.

**Ejemplo 2. Producción del anticuerpo monoclonal y cribado del anticuerpo**

2)-1 Inmunización

Se usaron ratones BALB/cAnNCrCrj (Charles River Laboratories Japan, Inc.), ratones FcγRII KO (Taconic, Inc., IBL Co., Ltd.) o ratones GANP (Transgenic, Inc.) a de 4 a 6 semanas de edad. Los días 0, 7, 15 y 24, células LNCaP, células MCF7 (ATCC) o células AsPC1 (ATCC) desprendidas con verseno (Invitrogen Corporation) se administraron por vía subcutánea a la región dorsal de cada ratón a una dosis de  $5 \times 10^6$  células/ratón. El día 31, las mismas células se administraron por vía intravenosa a cada ratón a una dosis de  $5 \times 10^6$  células. El día 34, el bazo se extirpó de cada ratón y se usó para la producción de hibridomas.

2)-2 Producción de hibridomas

Células esplénicas y células de mieloma de ratón P3X63Ag8U.1 (ATCC) se sometieron a fusión celular usando PEG 4000 (fabricado por IBL Co., Ltd.), produciendo de este modo hibridomas.

Como resultado, 9639 clones de los ratones inmunizados con células LNCaP, 4043 clones de los ratones inmunizados con células MCF7, y 3617 clones de los ratones inmunizados con células AsPC1 se establecieron como hibridomas. Usando el sobrenadante de cultivo obtenido de cada hibridoma, se cribó un hibridoma productor de anticuerpos mediante un ensayo de CDC.

2)-3 Cribado del anticuerpo mediante ensayo de CDC

El día 0, células LNCaP o células MCF7 se diluyeron a 5000 células por 80  $\mu$ l y la solución resultante se añadió a una placa de 96 pocillos a 80  $\mu$ l/pocillo. A continuación, las células se cultivaron durante una noche. El sobrenadante del cultivo de hibridoma se añadió a 20  $\mu$ l/pocillo a la placa en la que se sembraron las células, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 1 hora. A un complemento de conejo diluido y liofilizado (Cedarlane Laboratories), se le añadió 1 ml de agua estéril a cada vial sobre hielo, y el vial se dejó reposar durante 1 minuto, seguido de mezcla, y a continuación la mezcla resultante se mezcló con 19 ml de medio BSA/RPMI 1640 al 0,1 % (BSA, Sigma Co., Ltd.). Se dejó que una reacción continuara a 37 °C durante 1 hora.

La placa se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos para volver a temperatura ambiente. Se añadieron 120  $\mu$ l de reactivo CellTiter-Glo (Promega Corporation) a cada pocillo, y se dejó que la reacción continuara a temperatura ambiente durante 10 minutos. La cantidad de luminiscencia se midió usando un lector de placas (ARVO HTS, PerkinElmer, Inc.). En un pocillo que exhibe baja luminiscencia, se determinó que se indujo la muerte celular dependiente del complemento. Se seleccionó un hibridoma que producía un sobrenadante de cultivo que inducía tal muerte celular dependiente del complemento.

Como resultado, se obtuvieron 24 clones a partir de los clones derivados de la inmunización con LNCaP, 36 clones a partir de los clones derivados de la inmunización con MCF7, y 3 clones a partir de los clones derivados de la inmunización con AsPC1 como clones positivos mediante cribado.

**Ejemplo 3. Identificación del antígeno**

3)-1 Identificación de la sustancia inmunoprecipitada

3)-1-1 Inmunoprecipitación

Se cultivaron células MCF7 a de  $5$  a  $10 \times 10^8$  células. Estas células se desprendieron con un raspador celular y las células desprendidas se recogieron y crioconservaron a -80 °C. A las células crioconservadas, se les añadieron 10 ml de un tampón de lisis que contenía el 1 % de NP-40 (Sigma-Aldrich Co., Ltd.) y un inhibidor de proteasa (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.) y se enfriaron a 4 °C y el sedimento celular se lisó en hielo con una pipeta de tal manera que se evitó la formación de burbujas. Después de haber sido completamente lisado, el sedimento se dejó en hielo durante 30 minutos. La muestra solubilizada se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a de 10000 a 15000 rpm, y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml.

500  $\mu$ l de perlas de proteína G-Sepharose 4FF (Amersham Pharmacia Biotech Co., Ltd.) se lavaron tres veces y se sometieron a intercambio de tampón con un tampón de lisis. Se añadieron 500  $\mu$ l de las perlas de proteína G-Sepharose 4FF al sobrenadante de la muestra solubilizada en hielo, y la mezcla resultante se sometió a agitación rotatoria durante una noche a 4 °C.

La muestra se hizo pasar a través de columnas de cromatografía Poly-Prep (Bio-Rad Laboratories, Inc.), y se usó una fracción sometida a un pase como muestra de inmunoprecipitación.

Se añadieron 3  $\mu$ g de una solución de anticuerpo para inmunoprecipitación a 50  $\mu$ l de perlas de proteína G-Sepharose 4FF sometidas a intercambio de tampón con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (un tubo de 1,5 ml), y la mezcla resultante se sometió a agitación rotatoria a 4 °C durante de 1 a 16 horas, por lo que el anticuerpo se unió a las perlas. A la muestra de inmunoprecipitación, se le añadieron las perlas a las que se unió el anticuerpo, y la mezcla resultante se sometió a agitación rotatoria a 4 °C durante 3 horas.

La columna se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml vacío, y se añadieron a la misma 6,5 ml de un tampón de lisis. Este procedimiento se repitió 4 veces.

La salida de la columna se tapó y se realizó pipeteo con 500 µl de un tampón de lisis, y las perlas se recogieron en un tubo de 1,5 ml. Este procedimiento se repitió dos veces.

5 Después de la centrifugación a 4 °C durante 1 minuto a 5000 rpm, el sobrenadante se retiró cuidadosamente. A continuación, se le añadieron 90 µl de un tampón de elución (glicina-HCl 10 mM, pH 2,0), seguido de agitación en vórtice y centrifugación. La columna de columna de centrifugación de 1,5 ml se desprendió y se le añadieron 10 µl de Tris-HCl 1 M (pH 8,5) y la columna se devolvió al lugar original. Se transfirió a la misma una fracción de elución, y la centrifugación se realizó a 10000 rpm durante 1 minuto, con lo que se obtuvieron 100 µl de una muestra.

10 La muestra obtenida se sometió a análisis por MS mediante una técnica de digestión en fase líquida tal como se muestra en el siguiente 3)-1-2.

### 3)-1-2 Identificación del antígeno mediante análisis de espectrometría de masas

15 De acuerdo con procedimientos comunes, la fracción obtenida mediante el procedimiento de inmunoprecipitación se sometió a una reacción de digestión a 37 °C durante 16 horas añadiendo tripsina (tripsina modificada, Promega Corporation) a través de una técnica de digestión en fase líquida. Los péptidos digeridos resultantes se sometieron a cromatografía líquida (LC)/espectrómetros de masas en tándem (MS/MS) (Thermo Fisher Scientific K.K.). Los datos espectrales de masas obtenidos se analizaron usando el software de búsqueda en bases de datos (Mascot, Matrix Science K.K.). Como base de datos, se usó International Protein Index (IPI). Como resultado, se identificaron 34 tipos de antígenos.

20 A partir de las características de los antígenos identificados, se realizó la recuperación de información bibliográfica basándose en que B7-H3 es una proteína de la membrana celular, y centrándose en el antígeno B7-H3 (CD276) (variante 1 de B7-H3), se realizaron los experimentos descritos en los siguientes 3)-2 y 3)-3.

### 3)-2 Preparación de células que expresan genes del antígeno

25 Se sembraron células NIH-3T3 (ATCC) a  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en un matraz revestido con colágeno de tipo I (fabricado por IWAKI Co., Ltd.) y se cultivaron durante una noche en medio DMEM (Invitrogen Corporation) que contenía suero fetal bovino (FBS) al 10 % en las condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

30 Al día siguiente, las células NIH-3T3 se transfectaron con cada uno de pcDNA3.1-B7-H3 producido en el Ejemplo 1)-1-1, pcDNA-DEST40-B7-H3 variante 2 producido en 1)-1-2 y pcDNA-DEST40 que es un vector vacío, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation), y se cultivaron adicionalmente durante una noche en las condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

Al día siguiente, las células NIH-3T3 transfectadas se trataron con tripsina, y se lavaron con DMEM que contenía FBS al 10 %, y seguidamente se suspendieron en PBS que contenía FBS al 5 %. La suspensión celular obtenida de este modo se usó en un análisis por citometría de flujo.

### 3)-3 Análisis por citometría de flujo

35 La especificidad de unión, para B7-H3, del anticuerpo producido por el hibridoma que inmunoprecipitaba la variante 1 de B7-H3 identificada por MS se confirmó mediante un procedimiento de citometría de flujo. La suspensión celular preparada en el ejemplo 3)-2 se centrifugó y el sobrenadante se retiró. A continuación, el sobrenadante del cultivo de hibridoma se añadió a las células NIH-3T3 transfectadas con cada vector para suspender las células, y las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora.

40 Después de que las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5 %, se les añadió la fracción de IgG de cabra conjugada con fluoresceína a IgG de ratón (molécula completa) (fabricada por ICN Pharmaceuticals, Inc., N.º 55493) diluida hasta 1000 veces con PBS que contenía FBS al 5 % para suspender las células, y las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora.

45 Después de que las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5 %, las células se resuspendieron en PBS que contenía FBS al 5 % suplementado con 2 µg/ml de 7-aminoactinomicina D (fabricada por Invitrogen Corporation (Molecular Probes)), y la detección se realizó usando un citómetro de flujo (FC500, Beckman Coulter, Inc.). Los datos se analizaron usando Flowjo (Tree Star, Inc.).

Se excluyeron las células muertas positivas para 7-aminoactinomicina D usando un "portal". A continuación, se crearon los histogramas de intensidad de fluorescencia FITC de las células viables.

50 Un hibridoma que produjo una muestra que dio una mayor intensidad de fluorescencia en los histogramas de intensidad de fluorescencia de las células NIH-3T3 que expresan la variante 1 de B7-H3 y las células NIH-3T3 que expresan la variante 2 de B7-H3 que en el histograma de intensidad de fluorescencia de las células NIH-3T3 transfectadas con el vector vacío que sirve como control, se seleccionó como un hibridoma productor de anticuerpos



anti-B7-H3.

Como resultado, se descubrió que los anticuerpos derivados de los hibridomas productores de anticuerpos anti-B7-H3 de 5 clones (L7, L8, L11, M30 y M31) tienen reactividad cruzada con la variante 1 de B7-H3 y la variante 2 de B7-H3.

5 3)-4 Confirmación de la propiedad de unión de anticuerpo monoclonal a línea celular cancerosa

Se examinó si los anticuerpos monoclonales que se confirmó que se unían unirse a la variante 1 de B7-H3 y la variante 2 de B7-H3 en el ejemplo 3)-3 se unen a células cancerosas que sobreexpresan la variante 1 de B7-H3 y la variante 2 de B7-H3 mediante un procedimiento de citometría de flujo de la misma manera que en el Ejemplo 3)-3.

10 En lugar de las células NIH-3T3 transfectadas, se usaron una línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-231) (ATCC) y una línea celular de cáncer de pulmón humano (NCI-H322) (ATCC). Como resultado, se confirmó que todos los anticuerpos monoclonales establecidos se unen a estas líneas celulares cancerosas.

3)-5 Determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal

15 Los isotipos de los anticuerpos monoclonales se determinaron usando un kit de isotipado monoclonal de ratón (fabricado por Serotec Co., Ltd.). Como resultado, se determinó que los todos isotipos de los anticuerpos derivados de los hibridomas productores de anticuerpos anti-B7-H3 (L7, L8, L11, M30 y M31) eran IgG2a.

3)-6 Preparación del anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal se purificó a partir de la ascitis de un ratón implantado con un hibridoma o un sobrenadante de cultivo de hibridoma (en lo sucesivo, denominado "material de partida para la purificación de anticuerpos").

20 La ascitis del ratón se preparó de la siguiente manera. En primer lugar, los ratones BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA Japan, Inc.) de 7 a 8 semanas de edad se trataron con pristano (fabricado por Sigma Co., Ltd.), y después de aproximadamente 3 semanas, un hibridoma lavado con solución salina fisiológica se implantó dentro de la cavidad abdominal a  $1 \times 10^7$  células por ratón. Después de 1 a 2 semanas, la ascitis acumulada en la cavidad abdominal se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ , y el material resultante se usó como material de partida para la purificación de anticuerpos.

30 El sobrenadante del cultivo de hibridoma se preparó usando CELLline (fabricado por BD Biosciences, Inc.). El cultivo se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante, excepto que se utilizó medio ClonaCell-HY Growth Medium E (fabricado por StemCell Technologies, Inc., n.º 03805) como medio. El sobrenadante de cultivo recogido se filtró a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , y el material resultante se usó como material de partida para la purificación de anticuerpos.

35 El anticuerpo se purificó mediante una columna de afinidad obtenida inmovilizando proteína A recombinante rPA50 (fabricada por RepliGen Corporation) en formil-celulofina (fabricada por Seikagaku Corporation) (abreviada en lo sucesivo como "proteína A en formil-celulofina") o Hitrap MabSelect SuRe (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation). En el caso de la proteína A en formil-celulofina, el material de partida para la purificación de anticuerpos se diluyó a 3 veces con un tampón de unión (NaCl 3 M, glicina 1,5 M, pH 8,9), y la solución resultante se añadió a una columna, a continuación, la columna se lavó con el tampón de unión, seguido de elución con ácido cítrico 0,1 M (pH 4,0). Por otra parte, en el caso de Hitrap MabSelect SuRe (GE Healthcare Corporation), el material de partida para la purificación de anticuerpos se añadió a una columna, y la columna se lavó con PBS, seguido de elución con arginina-HCl 2 M (pH 4,0).

40 Después de neutralizar la solución de anticuerpo eluida, el tampón se intercambió con PBS.

45 La concentración del anticuerpo se obtuvo eluyendo el anticuerpo unido a una Columna POROS G de 20  $\mu\text{m}$  con PEEK, 4,6 mm x 100 mm, 1,7 ml (Applied Biosystems, Inc.) y midiendo la absorbancia (D.O. 280 nm) del eluato. Específicamente, se añadió una muestra de anticuerpo diluida con PBS a POROS G de 20  $\mu\text{m}$  equilibrada con un tampón de equilibrado (dihidrogenofosfato sódico 30,6 mM/12 ac., fosfato monopotásico 19,5 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0). A continuación, la columna se lavó con el tampón de equilibrado y el anticuerpo unido a la columna se eluyó a continuación con un eluyente (HCl al 0,1% (v/v), NaCl 0,15 M). Se midió el área del pico de la absorbancia (D.O. 280 nm) del eluato y se calculó la concentración de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} & \text{Concentración de la muestra de anticuerpo (mg/ml)} = \\ & \frac{(\text{área máxima de la muestra de anticuerpo})}{(\text{área máxima} \\ & \text{50 del estándar de referencia (IgG1 humana))} \times \\ & \text{Concentración del estándar de referencia (mg/ml)} \times \end{aligned}$$

## Factor de dilución de la muestra.

Además, la concentración de endotoxina contenida en el anticuerpo obtenido se midió usando el Endospecy ES-50M Set (Seikagaku Corporation, n.º 020150) y un estándar de referencia de endotoxina CSE-L Set (Seikagaku Corporation, n.º 020055) y se confirmó que era de 1 UE/mg o menos. El anticuerpo resultante se usó en el experimento posterior.

**Ejemplo 4. Producción del anticuerpo anti-B7-H3**

## 4)-1 Actividad ADCP

Se administró 1,5 ml de tioglicolato a la cavidad abdominal de un ratón Balb/c-nu/nu (hembra, de 6 a 10 semanas de edad) (Charles River Laboratories Japan, Inc.). 5 días después, se recogieron macrófagos de la cavidad abdominal. Los macrófagos se añadieron a una placa de 24 pocillos a 500 µl/pocillo ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) y se cultivaron durante una noche a 37 °C. Los macrófagos preparados de este modo se usaron como células efectoras.

El etiquetado de células NCI-H322 para usar como células diana se realizó usando el kit de etiquetado con colorante PKH26 (Sigma Co., Ltd.). Las células diana se separaron con TrypLE (Invitrogen Corporation) y se lavaron dos veces con PBS. Las células se suspendieron en diluyente C a  $1 \times 10^7$  células/ml. Se diluyó material colorante PKH26 (1 mM) hasta 8 µM con diluyente C, e inmediatamente después, se le añadió la solución colorante diluida en una cantidad igual a la de la suspensión celular. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se le añadió 1 ml de suero, y además, se le añadió un medio con suero, y se realizó el lavado dos veces. Las células preparadas de este modo se usaron como células diana.

El anticuerpo obtenido en el ejemplo 3)-6 se diluyó a 20 µg/ml con una solución de cultivo. Posteriormente, las células diana obtenidas en el ejemplo 4)-1-1 se dispensaron a  $2 \times 10^6$  células/100 µl/tubo y se mezclaron. La mezcla resultante se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se retiró, y las células se lavaron dos veces con una solución de cultivo y se suspendieron en 500 µl de una solución de cultivo. El sobrenadante se retiró de las células efectoras, y las células que habían sido tratadas con el anticuerpo y suspendidas en la solución de cultivo se añadieron a la misma y se mezclaron con la misma. A continuación, las células se cultivaron durante 3 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Seguidamente, las células se separaron con tripsina-EDTA y se recogieron. A las células recogidas, se les añadió un anticuerpo anti-CD11b de ratón etiquetado con FITC (Becton, Dickinson and Company, Ltd.), y la mezcla resultante se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se retiró y las células se lavaron dos veces con una solución de cultivo. Las células recogidas se suspendieron en 300 µl de una solución de cultivo y se analizaron mediante FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company, Ltd.). En los macrófagos positivos para CD11b, se evaluó una fracción positiva para PKH26 como células positivas para fagocitosis (n=3).

Como resultado, tal y como se muestra en la figura 1, L7, L8, L11, M30 y M31 indujeron la fagocitosis de las células NCI-H322 por macrófagos para dar un porcentaje de fagocitosis del 48,0 ± 0,9 %, 52,3 ± 1,1%, 57,1 ± 2,5 %, 61,9 ± 2,1 % y 57,7 ± 3,0 %, respectivamente. Por consiguiente, se demostró que los anticuerpos L7, L8, L11, M30 y M31 tienen actividad ADCP contra células NCI-H322.

De la misma manera, se obtuvieron anticuerpos anti-B7-H3 disponibles en el mercado y se midió la actividad ADCP de los mismos. Se obtuvieron un anticuerpo anti-B7-H3 humana de rata MIH35 (eBioscience Company), un anticuerpo anti-B7-H3 humana de ratón 185504 (R&D Systems, Inc.), MIH42 (Serotec Co., Ltd.) y DCN70 (Biolegend Company). Se confirmó que estos anticuerpos se unen a B7-H3 de la misma manera que en el ejemplo 3)-3. Usando estos anticuerpos, la actividad ADCP se midió mediante el procedimiento anterior.

Como resultado, tal y como se muestra en la figura 2, cuando se añaden a 1 µg/ml, MIH35, MIH42 y DCN70 indujeron la fagocitosis de las células NCI-H322 por los macrófagos para dar un porcentaje de fagocitosis del 4,2 %, 8,2 % y 10,8 %, respectivamente. Por consiguiente, se reveló que MIH35, MIH42 y DCN70 no exhibían casi ninguna actividad ADCP.

A partir de estos resultados, se demostró que los clones de M30 que reconocen B7-H3 obtenidos por cribado tienen una actividad ADCP notablemente más alta que los anticuerpos contra B7-H3 disponibles en el mercado.

## 4)-2 Actividad ADCC

## 4)-2-1 Preparación de células efectoras

El bazo se extirpó asépticamente de un ratón desnudo CAnN.Cg-Foxn1<sup>nu</sup>/CrlCrlj (Charles River Laboratories Japan, Inc.). El bazo extirpado se homogeneizó con dos portaobjetos de vidrio y se sometió a un tratamiento de hemólisis usando BD Pharm Lyse (fabricado por BD Biosciences, Ltd. n.º 555899). Las células esplénicas obtenidas de este modo se suspendieron en RPMI 1640 libre de rojo de fenol (fabricado por Invitrogen Corporation) que contenía suero fetal bovino al 10 %, IgG ultrabaja (fabricada por Invitrogen Corporation) (en lo sucesivo abreviado como "medio de ADCC"), y la suspensión celular se hizo pasar a través de un filtro celular (tamaño de poro: 40 µm, fabricado por BD

Biosciences, Ltd.). A continuación, las células viables se contaron mediante un ensayo de exclusión con colorante azul de tripano. Después de que la suspensión de células esplénicas se centrifugó, se retiró el medio, y las células se resuspendieron en el medio de ADCC a una densidad celular viable de  $1,5 \times 10^7$  células/ml y se usaron como células efectoras.

#### 5 4)-2-2 Preparación de células dianas

Células 293 que expresan B7-H3 (ATCC) y células 293 transfectadas con el vector vacío preparadas de la misma manera que en el ejemplo 3)-3 se trataron con tripsina, y las células tratadas de cada tipo se lavaron con RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (Invitrogen Corporation) y a continuación se resuspendieron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10 %. Las células ( $4 \times 10^6$  células) de cada tipo se mezclaron con cromo-51 (5550 kBq) se esterilizaron a través de un filtro de  $0,22 \mu\text{m}$  y se realizó el etiquetado durante 1 hora en las condiciones de  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5 %. Las células etiquetadas se lavaron tres veces con RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (Invitrogen Corporation), y las células se resuspendieron a  $2 \times 10^5$  células/ml en el medio de ADCC y se usaron como células diana.

#### 4)-2-3 Ensayo de liberación de $^{51}\text{Cr}$

Las células diana a una densidad celular de  $2 \times 10^5$  células/ml se dispensaron a  $50 \mu\text{l}$ /pocillo en una microplaca de 96 pocillos de fondo en forma de U. Se les añadieron  $50 \mu\text{l}$  de M30 o un anticuerpo de control de isotipo (mIgG2a) (eBioscience Company), se diluyeron con el medio de ADCC de modo que la concentración final del anticuerpo después de añadir las células efectoras fuera de  $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ . A continuación, la placa se dejó reposar a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Seguidamente, se añadieron  $100 \mu\text{l}$  de las células efectoras a una densidad celular de  $1,5 \times 10^7$  células/ml, y las células se cultivaron durante una noche en las condiciones de  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5 %. Al día siguiente, el sobrenadante se recogió en un LumaPlate (fabricado por PerkinElmer, Inc.), y la radiación gamma emitida a partir del mismo se midió usando un contador gamma. El porcentaje de lisis celular causado por la actividad ADCC se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Porcentaje de lisis celular (\%)} = (A-B) / (C-B) \times 100$$

A: Recuento de radiación procedente del pocillo de muestra

B: Recuento promedio de emisión de radiación espontánea (procedente de pocillos a los que no se añadieron el anticuerpo y las células efectoras) ( $n=3$ ). Se realizó el mismo procedimiento que para el pocillo de muestra, excepto que el medio de ADCC se añadió en una cantidad de  $50 \mu\text{l}$  en el momento de la adición del anticuerpo y en una cantidad de  $100 \mu\text{l}$  en el momento de la adición de las células efectoras.

C: Recuento promedio de emisión de radiación máxima (procedente pocillos en los que las células diana se disolvieron con un tensioactivo) ( $n=3$ ). Se realizó el mismo procedimiento que para el pocillo de muestra, excepto que se añadieron  $50 \mu\text{l}$  del medio de ADCC en el momento de la adición del anticuerpo y se añadieron  $100 \mu\text{l}$  del medio de ADCC que contenía Triton X-100 al 2 % (v/v) en el momento de la adición de las células efectoras.

Los datos mostrados son un promedio de mediciones por triplicado, y las barras de error representan desviaciones estándar. El valor P se calculó usando la prueba de la t de Student. Los resultados de la medición se muestran en la figura 3.

Como resultado, M30 exhibió actividad de lisis celular con un porcentaje de lisis celular del  $31,6 \pm 3,3\%$  contra las células 293 que expresan B7-H3 y, por lo tanto, se demostró que el anticuerpo M30 tiene actividad ADCC contra las células 293 que expresan B7-H3.

#### 4)-3 Actividad CDC

Se realizó un experimento de la misma forma que en el ejemplos 2)-3. Como células para su uso en la evaluación, se usaron células NCI-H322. Se añadieron cada uno de los anticuerpos anti-B7-H3 (L7, L8, L11, M30 y M31) obtenidos en el ejemplo 3)-6 y un anticuerpo de control de isotipo (mIgG2a) diluido con RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (que contenía antibióticos: penicilina y estreptomycin), de modo que la concentración final del anticuerpo después de añadir el complemento fuera de  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ , y la mezcla resultante se dejó reposar a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 hora. A esto se le añadió complemento de conejo (fabricado por Cedarlane Laboratories, n.º CL3051) diluido al 30 % con RPMI 1640 de modo que la concentración final del complemento fue del 5 %, y la mezcla resultante se incubó durante 1 hora en las condiciones de  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5 %. A continuación, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para medir la viabilidad celular, se le añadió al ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation) en una cantidad igual a la de la solución de cultivo, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, se midió la cantidad de luminiscencia usando un lector de placas. La viabilidad celular se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = (a-b) / (c-b) \times 100$$

a: Cantidad de luminiscencia procedente del pocillo de muestra

b: Cantidad promedio de luminiscencia del fondo (procedente de los pocillos a los que no se añadieron las

células y el anticuerpo) (n=3). Se realizó el mismo procedimiento que para el pocillo de muestra, excepto que se añadió una cantidad igual de RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (que contenía antibióticos: penicilina y estreptomycin) en lugar de la suspensión celular en el momento de la siembra celular y RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (que contenía antibióticos: penicilina y estreptomycin) en una cantidad igual a la de la solución de dilución de anticuerpo en el momento de la adición del anticuerpo.

5 c: Cantidad promedio de luminiscencia procedente de pocillos a los que no se añadió el anticuerpo (n=3). Se realizó el mismo procedimiento que para el pocillo de muestra, excepto que se añadió una cantidad igual de RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (que contenía antibióticos: penicilina y estreptomycin) en una cantidad igual a la de la solución de dilución de anticuerpo en el momento de la adición del anticuerpo.

10 Los resultados de la medición se muestran en la figura 4. Los datos mostrados son un promedio de mediciones por triplicado, y las barras de error representan desviaciones estándar. Como resultado, el anticuerpo de control, L7, L8, L11, M30 y M31 indujeron una disminución de la viabilidad celular de las células NCI-H322 al  $101,5 \pm 3,3$  %,  $6,3 \pm 4,2$  %,  $13,6 \pm 9,1$  %,  $7,2 \pm 1,4$  %,  $7,5 \pm 1,8$  % y  $12,8 \pm 2,0$  %, respectivamente, en presencia de complemento. Por lo tanto, se demostró que los anticuerpos L7, L8, L11, M30 y M31 tienen actividad CDC contra las células NCI-H322.

#### 15 4)-4 Determinación del dominio de unión

Se examinó a qué dominio de B7-H3 se une M30 mediante un procedimiento de citometría de flujo de la misma forma que en el ejemplo 3)-3. Se usaron las células NIH-3T3 transfectadas con cada uno de los vectores de expresión para proteínas parciales de B7-H3 preparados en el ejemplo 1)-1-3.

20 Como resultado, tal y como se muestra en la figura 5, se confirmó que M30 se une a B7-H3 IgC1, B7-H3 IgC2, B7-H3 IgC1-V2-C2 y B7-H3 IgV2-C2. M30 no se unió a B7-H3 IgV1 y B7-H3 IgV2.

A partir de estos resultados, se demostró que M30 se une al dominio C1 (la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 140 a 244 en la SEQ ID NO: 6) y al dominio C2 (la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 358 a 456 en la SEQ ID NO: 6) de B7-H3. De la misma manera, también se demostró que L8, L11 y M31 se unen al dominio C1 y al dominio C2, y L7 se une al dominio V1 (la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 27 a 139 en la SEQ ID NO: 6) y el dominio V2 (la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 245 a 357 en la SEQ ID NO: 6).

25

Por consiguiente, se demostró que M30 reconoce un epítipo en el dominio IgC1 y / o el dominio IgC2, cada uno de los cuales es un dominio en el dominio extracelular de B7-H3, y se une al dominio IgC1 o al dominio IgC2 o a ambos.

#### 4)-5 Especificidad por el antígeno

30 Se examinó la especificidad por el antígeno de M30 mediante un procedimiento de citometría de flujo de la misma forma que en el ejemplo 3)-3.

Se usaron células 293T transfectadas con cada uno de los vectores de expresión para las proteínas CD80, CD86, B7-RP-1, B7-H1, B7-DC y B7-H4, que son proteínas de la familia B7, preparadas en el ejemplo 1)-1-4.

35 Como resultado, se demostró que M30 no se une a CD80, CD86, B7-RP-1, B7-H1, B7-DC y B7-H4, que son moléculas de la familia B7.

### **Ejemplo 5. Efecto antitumoral in vivo**

#### 5)-1 Efecto antitumoral in vivo del anticuerpo anti-B7-H3

Se desprendieron células NCI-H322 de un matraz de cultivo mediante un tratamiento con tripsina, y a continuación se suspendieron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (Invitrogen Corporation), seguido de centrifugación, y el sobrenadante se retiró. Las células se lavaron dos veces con el mismo medio, y a continuación se suspendieron en solución salina fisiológica (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.). A continuación, las células se implantaron por vía subcutánea en la región axilar de cada uno de un grupo de ratones BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA Japan, Inc.) a las 6 semanas de edad a una dosis de  $1 \times 10^7$  células/ratón. El día de la implantación se tomó como el día 0, y los días 10, 17, 24, 31 y 38, cada uno de los anticuerpos L7, L8, L11, M30 y M31 se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 500 µg/ratón (aproximadamente 25 mg/kg). Al control, se le administró PBS por vía intraperitoneal en un volumen (500 µl) igual al del anticuerpo. El volumen tumoral se midió los días 10, 17, 24, 31, 38 y 45, y se examinó el efecto antitumoral de la administración del anticuerpo.

40

45

Como resultado, en los grupos de administración de M30 y M31, el crecimiento del tumor se suprimió significativamente en comparación con el grupo de administración de PBS. (Los valores P para M30 y M31 en comparación con el grupo de administración de PBS en términos del volumen del tumor en el día 45 fueron  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ , respectivamente. Los valores P se calcularon usando la prueba de la t de Student). Además, la relación de inhibición del crecimiento tumoral ( $= 100 - (\text{volumen tumoral promedio en el grupo de administración de anticuerpos}) / (\text{volumen tumoral promedio en el grupo de administración de PBS}) \times 100$ ) el día 45 en el caso de L7, L8, L11, M30 y M31 fue -16,1 %, 0,2 %, 25,5 %, 47,2 % y 58,2 %, respectivamente. Por consiguiente, se observó

50

que los anticuerpos M30 y M31 tenían un efecto antitumoral muy fuerte in vivo (figura 6).

A partir de los resultados anteriores, se reveló que los anticuerpos M30 y M31 son anticuerpos que reconocen un antígeno B7-H3 y exhiben un efecto antitumoral.

5)-2 Efecto antitumoral in vivo en condiciones de agotamiento de macrófagos

5 Con el fin de agotar los macrófagos in vivo, se produjeron liposomas encapsulados en clodronato. Se ha notificado que administrando liposomas encapsulados en clodronato in vivo, se agotan los macrófagos in vivo (Journal of immunological methods 1994, vol. 174, págs. 83-93). De acuerdo con el procedimiento en este informe, se produjeron liposomas encapsulados en clodronato y se usaron en el siguiente experimento.

10 Se desprendieron células NCI-H322 de un matraz de cultivo mediante un tratamiento con tripsina, y a continuación se suspendieron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (Invitrogen Corporation), seguido de centrifugación y el sobrenadante se retiró. Las células se lavaron dos veces con el mismo medio, y a continuación se suspendieron en solución salina fisiológica (PBS, fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.). A continuación, las células se implantaron por vía subcutánea en la región axilar de cada ratón BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA Japan, Inc.) a las 6 semanas de edad a una dosis de  $1 \times 10^7$  células/ratón. El día de la implantación se tomó como el día -14, y el agrupamiento se realizó el día 0.

15 En un grupo en el que debían agotarse los macrófagos in vivo en los ratones, los liposomas encapsulados en clodronato se inyectaron por vía intravenosa a una dosis de 0,2 ml/ratón los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28 y 32. Además, en el grupo de control negativo, se inyectó PBS por vía intravenosa a una dosis de 0,2 ml/ratón los mismos días (los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28 y 32).

20 Posteriormente, el anticuerpo M30 se administró por vía intraperitoneal a ambos grupos a una dosis de 500 µg/ratón (aproximadamente 25 mg/kg) los días 1, 8, 15, 22 y 29. Además, como control negativo, se administró PBS por vía intraperitoneal. para ambos grupos en un volumen (500 µl) igual al del anticuerpo M30 los mismos días (los días 1, 8, 15, 22 y 29).

25 El volumen tumoral se midió los días 0, 8, 15, 22, 29 y 36, y se examinó el efecto antitumoral de la administración del anticuerpo (n=8).

Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2, y la figura 7.

[Tabla 1]

Volumen tumoral	El día 0		El día 8		El día 15	
	Promedio (mm <sup>3</sup> )	Desviación estándar	Promedio (mm <sup>3</sup> )	Desviación estándar	Promedio (mm <sup>3</sup> )	Desviación estándar
Grupo de administración de PBS + PBS	104,375	6,491581086	149	10,60828517	227,5	18,20027472
Grupo de administración de lip clod + PBS	114,625	4,862162585	159,375	7,676349346	318,625	26,37567704
Grupo de administración de PBS + M30	103,5	7,221001118	123,625	14,89958952	145	19,58497967
Grupo de administración de lip clod + M30	104,625	5,47049717	143,375	10,46753058	247,75	24,44947414

Volumen tumoral	El día 22		El día 29		El día 36	
	Promedio (mm <sup>3</sup> )	Desviación estándar	Promedio (mm <sup>3</sup> )	Desviación estándar	Promedio (mm <sup>3</sup> )	Desviación estándar
Grupo de administración de PBS + PBS	394,75	25,77772433	601,25	43,17065389	827	50,82638516
Grupo de administración de lip clod + PBS	443,625	23,52653327	619,75	40,9550058	1002,75	78,18493415
Grupo de administración de PBS + M30	186,25	25,920035	301,75	47,13610612	415,25	79,84175197

(continuación)

Volumen tumoral	El día 22		El día 29		El día 36	
	Promedio (mm <sup>3</sup> )	Desviación estándar	Promedio (mm <sup>3</sup> )	Desviación estándar	Promedio (mm <sup>3</sup> )	Desviación estándar
Grupo de administración de lip clod + M30	384,25	40,10644319	641,375	80,12176838	837,25	121,349223

En el grupo de administración intravenosa de PBS + administración intraperitoneal de anticuerpo M30 (grupo de administración de PBS + M30), el crecimiento tumoral se suprimió significativamente en comparación con el grupo de administración intravenosa de PBS + administración intraperitoneal de PBS (grupo de administración de PBS + PBS) que actúa como el control negativo. Para ser más específicos, el valor P para el grupo de administración de PBS + M30 en comparación con el grupo de administración de PBS + PBS en términos del volumen tumoral en el día 36 fue  $P < 0,05$  (el valor P se calculó usando la prueba de la t de Student). Además, la relación de inhibición del crecimiento tumoral ( $= 100 - (\text{volumen tumoral promedio en el grupo de administración de PBS + M30}) / (\text{volumen tumoral promedio en el grupo de administración de PBS + PBS}) \times 100$ ) el día 36 fue del 49,8 % (tabla 2).

Por otra parte, en el grupo de administración intravenosa de liposomas encapsulados en clodronato + administración intraperitoneal de PBS (grupo de administración de lip clod + PBS) y el grupo de administración intravenosa de liposomas encapsulados en clodronato + administración intraperitoneal de anticuerpo M30 (grupo de administración de lip clod + M30), no se observó supresión del crecimiento tumoral. Para ser más específicos, los valores de P para el grupo de administración de lip clod + PBS y el grupo de administración de lip clod + M30 en comparación con el grupo de administración de PBS + PBS en términos del volumen tumoral el día 36 fueron  $P = 0,52$  y  $P = 1$ , respectivamente. (Los valores P se calcularon usando la prueba de la t de Student). Además, las relaciones de inhibición del crecimiento tumoral ( $= 100 - (\text{volumen tumoral promedio en el grupo de administración de lip clod + PBS o el grupo de administración de lip clod + M30}) / (\text{volumen tumoral promedio en el grupo de administración de PBS + PBS}) \times 100$ ) el día 36 fueron: -21,2 % y -1,4 %, respectivamente (tabla 2).

[Tabla 2]

Relación de inhibición del crecimiento tumoral (%)	El día 8	El día 15	El día 22	El día 29	El día 36
Grupo de administración de lip clod + PBS	-6,6	-39,4	-12,6	-3,5	-21,2
Grupo de administración de PBS + M30	17,5	36,4	52,8	49,7	49,8
Grupo de administración de lip clod + M30	3,2	-8,6	2,6	-6,6	-1,4

A partir de los resultados anteriores, se demostró que el efecto antitumoral del anticuerpo M30 se suprimió mediante la administración de liposomas encapsulados en clodronato y, por lo tanto, se reveló que el efecto antitumoral del anticuerpo M30 es principalmente un efecto mediado por macrófagos.

#### Ejemplo 6. Clonación de ADNc del anticuerpo M30 de ratón y determinación de la secuencia

6)-1 Determinación de secuencias de aminoácidos N-terminales de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo M30 de ratón

Con el fin de determinar las secuencias de aminoácidos N-terminales de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo M30 de ratón, el anticuerpo M30 de ratón purificado en el ejemplo 3)-6 se separó mediante SDS-PAGE. La proteína en el gel se transfirió del gel después de la separación a una membrana de PVDF (tamaño de poro: 0,45  $\mu\text{m}$ , fabricada por Invitrogen Corporation). La membrana se lavó con un tampón de lavado (NaCl 25 mM, tampón de borato de sodio 10 mM pH 8,0) y seguidamente se tiñó sumergiéndola en una solución de colorante (metanol al 50 %, ácido acético al 20 %, azul de Coomassie brillante al 0,05 %) durante 5 minutos, seguido de decoloración con metanol al 90 %. Las partes de la banda correspondiente a la cadena pesada (la banda con menor movilidad) y la banda correspondiente a la cadena ligera (la banda con mayor movilidad) visualizadas sobre la membrana de PVDF se escindieron.

La parte de la banda correspondiente a la cadena ligera se incubó a 37 °C durante 30 minutos en una pequeña cantidad de una solución de polivinilpirrolidona al 0,5 %/ácido acético 100 mM, seguido de un lavado con agua. Posteriormente, se eliminó el resto N-terminal modificado usando el kit Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase (TaKaRaBio, Inc.), seguido de lavado con agua y secado al aire. A continuación, se realizó un intento de identificar sus secuencias de aminoácidos N-terminales respectivas mediante un procedimiento de Edman automático (véase Edman y col. (1967) Eur. J. Biochem. 1,80) usando el secuenciador de proteínas Procise (marca registrada) cLC modelo 492cLC (Applied Biosystems, Inc.).

Como resultado, se determinó que la secuencia de aminoácidos N-terminal de la banda correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo M30 de ratón era EVQLQQSGPE (SEQ ID NO: 44 en el listado de secuencias), y se determinó que la secuencia de aminoácidos N-terminal de la banda correspondiente a la cadena ligera del mismo era IVLSQSPTILSASP (SEQ ID NO: 45 en el listado de secuencias).

6)-2 Preparación de ARNm a partir de hibridoma productor de anticuerpo M30 de ratón

Con el fin de clonar los ADNc que codifican cada una de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo M30 de ratón, se preparó ARNm a partir del hibridoma productor de anticuerpo M30 de ratón usando el kit de purificación de ARNm Quick Prep (GE Healthcare Corporation).

5 6)-3 Clonación de ADNc del anticuerpo M30 de ratón y determinación de la secuencia

Con referencia a los descubrimientos de que los isotipos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo M30 son de ratón  $\gamma$ 2a y  $\kappa$  descubiertos en el ejemplo 3)-5, y las secuencias de aminoácidos N-terminales de las cadenas pesada y ligera determinadas en el ejemplo 1-1), y la base de datos de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos (véase Kabat, E. A. y col., (1991) en Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. I y II, U.S. Department of Health and Human Services), se sintetizaron varios cebadores de oligonucleótidos que hibridan con cada una de la región 5'-terminal de una región de codificación del gen de anticuerpo y la región 3'-terminal del mismo que comprende un codón de terminación, y un ADNc que codifica la cadena pesada y un ADNc que codifica la cadena ligera se amplificaron usando el ARNm preparado en el ejemplo 6-2) y el kit TaKaRa One Step RNA PCR (AMV) (TaKaRa Bio, Inc.). Como resultado, el ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo y el ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo podían amplificarse mediante los siguientes conjuntos de cebadores.

Conjunto de cebadores para la cadena pesada

Cebador 16

5'-aagaattcatggaatggagtgata-3' (SEQ ID NO: 46 en el listado de secuencias)

Cebador 17

20 5'-aagatatctcatttaccggagtcgggagaa-3' (SEQ ID NO: 47 en el listado de secuencias)

Conjunto de cebadores para la cadena ligera

Cebador 18

5'-aagaattcatggattttctggtgcag-3' (SEQ ID NO: 48 en el listado de secuencias)

Cebador 19

25 5'-aagatatcttaacactcattcctgtgaagct-3' (SEQ ID NO: 49 en el listado de secuencias)

Cada uno del ADNc que codifican la cadena pesada y el ADNc que codifica la cadena ligera amplificados por PCR se clonó usando el kit de expresión pEF6/V5-His TOPO TA (Invitrogen Corporation) y cada una de las secuencias de nucleótidos de la cadena pesada y la cadena ligera clonadas se determinó usando un analizador de secuencias génicas ("ABI PRISM 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems" o "Applied Biosystems 3730xl Analyzer; Applied Biosystems"). En la reacción de secuenciación, se usó GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Inc.).

30 La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo M30 de ratón está representada por la SEQ ID NO: 50 en el listado de secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 51. Además, las secuencias de las SEQ ID NO: 50 y 51 se muestran en la figura 21.

35 La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo M30 de ratón está representada por la SEQ ID NO: 52 en el listado de secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 53 en el listado de secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 52 y 53 se muestran en la figura 22.

40 Además, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera se analizaron mediante comparación usando KabatMan (véase PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133), que es la base de datos de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos. Como resultado, se descubrió que, en la cadena pesada del anticuerpo M30 de ratón, la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 51 en el listado de secuencias es la región variable. También se descubrió que, en la cadena ligera del anticuerpo M30 de ratón, la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 23 a 130 en la SEQ ID NO: 53 en el listado de secuencias es la región variable.

**Ejemplo 7. Producción del anticuerpo quimérico M30 (anticuerpo cM30)**

7)-1 Construcción del vector de expresión de cadena ligera quimérico y humanizado pEF6KCL

Realizando la PCR usando un plásmido pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) como modelo y también usando los siguientes cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN desde inmediatamente corriente abajo de BGHpA (posición en la secuencia: 2174) hasta SmaI (posición en la secuencia: 2958) (un fragmento de ADN que comprende el origen de replicación f1 y el promotor y origen de SV40, en lo sucesivo denominado "fragmento A").

Cebador 20

5'-ccacgcgcctgtagcggcgccattaagc-3' (SEQ ID NO: 54 en el listado de secuencias)

Cebador 21

55 5'-aaacccgggagcttttgcaaaagcctagg-3' (SEQ ID NO: 55 en el listado de secuencias)

El fragmento A obtenido y un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 56, denominado en lo sucesivo "fragmento B", la secuencia de la SEQ ID NO: 56 también se muestra en la figura 23) que comprende una secuencia de ADN que codifica una señal secretora de cadena  $\kappa$  humana, una región constante de cadena  $\kappa$  humana, y una señal adicional de poli-A humana se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapada. El fragmento de ADN obtenido de este modo en el que el fragmento A y el fragmento B se ligaron entre sí se digirió con las enzimas de restricción KpnI y SmaI, que se ligó a un plásmido pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) que se digirió con las enzimas de restricción KpnI y SmaI, con lo que se construyó un vector de expresión de cadena ligera quimérico y humanizado pEF6KCL que tiene una secuencia señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena  $\kappa$  humana y una secuencia señal adicional de poli A humana corriente abajo del promotor EF1.

#### 7)-2 Construcción de pEF1KCL

Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el pEF6KCL obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente con las enzimas de restricción KpnI y SmaI se ligó a pEF1/myc-HisB (Invitrogen Corporation) que se digirió con KpnI y SmaI, con lo que se construyó un plásmido pEF1KCL.

#### 7)-3 Construcción del vector de expresión de cadena pesada quimérico y humanizado pEF1FCCU

Un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 57, la secuencias de la SEQ ID NO: 57 también se muestra en la figura 24) que comprende una secuencia de ADN que codifica aminoácidos de una secuencia señal y una región constante de IgG1 humana se digirió con las enzimas de restricción NheI y PmeI y se ligó al plásmido pEF1KCL que se digirió con NheI y PmeI, con lo que se construyó un vector de expresión de cadena pesada quimérico y humanizado pEF1FCCU que tiene una secuencia señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena pesada humana y una secuencia señal adicional de poli A humana corriente abajo del promotor EF1.

#### 7)-4 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo quimera de M30

Usando el ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo M30 de ratón como modelo y también usando KOD-Plus- (TOYOBO, Co., Ltd.) y el siguiente conjunto de cebadores, se amplificó una región que comprende el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera. Se insertó un fragmento de ADN obtenido escindiendo el producto amplificado con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado y quimérico universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, con lo que se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo quimera de M30. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó "pEF6KCL/M30L". La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo quimera de M30 se representa mediante la SEQ ID NO: 58 en el listado de secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 59. Las secuencias de las SEQ ID NO: 58 y 59 se muestran en la figura 25. Por cierto, un resto de treonina en la posición 128 en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo cM30 representada por la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias está ubicado en el extremo carboxilo de la región variable de cadena ligera y corresponde a un resto de alanina en la posición 130 en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo M30 representada por la SEQ ID NO: 53 en el listado de secuencias, sin embargo, en la secuencia de aminoácidos representada mediante la SEQ ID NO: 59, el resto ya ha sido sustituido con un resto de treonina derivado de una cadena ligera de anticuerpo humano.

Conjunto de cebadores para la cadena ligera

Cebador 22

5'-aaacatatggccaaattgttctctcccagctccaacaatcc-3' (SEQ ID NO: 60 en el listado de secuencias)

Cebador 23

5'-aaacgtacgttccagctccagcttggtcccagctaccg-3' (SEQ ID NO: 61 en el listado de secuencias)

#### 7)-5 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de tipo quimera de M30

Usando el ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo de ratón M30 como modelo, se ligó un fragmento de ADN obtenido mediante PCR usando KOD-Plus- (TOYOBO, Co., Ltd.) y el siguiente conjunto de cebadores A a un fragmento de ADN obtenido realizando la PCR usando el siguiente conjunto de cebadores B mediante PCR de extensión solapada usando el siguiente conjunto de cebadores C, con lo que se retiró la BlnI en la región variable y también se amplificó una región que comprende el ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada. Se insertó un fragmento de ADN obtenido escindiendo el producto amplificado con la enzima de restricción BlnI en el vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo humanizado y quimérico universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, con lo que se construyó un vector de expresión de cadena pesada de tipo quimera de M30. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó "pEF1FCCU/M30H".

La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo quimera de M30 se representa mediante la SEQ ID NO: 62 en el listado de secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 63. Además, las secuencias de las SEQ ID NO: 62 y 63 se muestran en la figura 26.

Conjunto de cebadores A



Cebador 24

5'-aaagctgagcggaggtccagctgcagcagctggacctgag-3' (SEQ ID NO: 64 en el listado de secuencias)

Cebador 25

5'-gaggtcaggctgctgagttccatgtaggctgtgctg-3' (SEQ ID NO: 65 en el listado de secuencias)

5 Conjunto de cebadores B

Cebador 26

5'-cagcacagcctacatggaactcagcagcctgacctc-3' (SEQ ID NO: 66 en el listado de secuencias)

Cebador 27

5'-aaagctgagctgactgtgagagtggcctggccccag-3' (SEQ ID NO: 67 en el listado de secuencias)

10 Conjunto de cebadores C

Cebador 28

5'-aaagctgagcggaggtccagctgcagcagctggacctgag-3' (SEQ ID NO: 68 en el listado de secuencias)

Cebador 29

5'-aaagctgagctgactgtgagagtggcctggccccag-3' (SEQ ID NO: 69 en el listado de secuencias)

15 7)-6 Preparación del anticuerpo quimérico de M30

7)-6-1 Producción del anticuerpo quimérico de M30

Se sembraron  $1,2 \times 10^9$  células de células FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) en la fase de crecimiento logarítmico en 1,2 l de medio de expresión FreeStyle 293 fresco (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora mediante agitación a 90 rpm a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilenimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, se suspendieron pEF1FCCU/M30H (0,4 mg) y pEF6KCL/M30L (0,8 mg) preparados con el kit PureLink HiPure Plasmid (Invitrogen Corporation) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. A continuación, se añadieron 20 ml de líquido mixto de vectores de expresión/Opti-Pro SFM obtenido a 20 ml del líquido mixto de polietilenimina/Opti-Pro SFM obtenido, y la mezcla resultante se agitó suavemente y a continuación se dejó reposar durante 5 minutos. Seguidamente, la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F, y se realizó cultivo en agitación a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 8 %. El sobrenadante del cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec n.º CCS-045-E1H).

Un anticuerpo quimérico de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30H y pEF6KCL/M30L se denominó "cM30" o "anticuerpo cM30".

30 7)-6-2 Purificación de cM30

El sobrenadante de cultivo obtenido en el ejemplo 7) -6-1 se purificó mediante un procedimiento de dos etapas que incluía cromatografía de afinidad con rProtein A (a de 4 a 6 °C) (GE Healthcare Japan Corporation) e hidroxapatita cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de intercambio de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad con rProtein A y después de la purificación con hidroxapatita cerámica a temperatura ambiente. En primer lugar, se aplicaron de 1100 a 1200 ml del sobrenadante de cultivo a MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectadas en serie) equilibrado con PBS. Después de que toda la solución de cultivo se vertió en la columna, la columna se lavó con de 15 a 30 ml de PBS. Posteriormente, la elución se realizó con una solución de hidrócloruro de arginina 2 M (pH 4,0) y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna de desalación (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, dos columnas de desalación HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), con lo que el tampón se intercambió con un tampón que contenía fosfato de sodio 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5.

Además, la solución de anticuerpo sometida a intercambio de tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., columna de hidroxapatita CHT2-1 Bio-Scale (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contiene NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. A continuación, se realizó una elución del gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna de desalación (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, dos columnas de desalación HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), con lo que el líquido se intercambió con CBS (que contenía tampón citrato 10 mM y cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0).

Finalmente, la solución resultante se concentró usando el dispositivo de filtro de UF centrífugo VIVASPIN 20 (peso molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 4 °C), y la concentración de IgG se ajustó a 1,0 mg/ml o más, y la solución obtenida de este modo se usó como muestra purificada.

**Ejemplo 8. Actividad del anticuerpo cM30**

8)-1 Actividad de unión del anticuerpo cM30 a B7-H3

La afinidad entre el anticuerpo M30 o el anticuerpo cM30 y el antígeno B7-H3 se midió mediante un dispositivo de resonancia del plasmón superficial (SPR) (GE Healthcare Corporation). De acuerdo con procedimientos comunes, un anticuerpo anti-IgG de ratón o un anticuerpo anti-IgG humana se inmovilizó en un chip sensor, y a continuación, se le unió la muestra de anticuerpo M30 o el anticuerpo cM30. Seguidamente, se añadió un polipéptido del dominio extracelular de un antígeno variante 2 de B7-H3 recombinante (fabricado por R&D Systems, Inc., n.º 2318-B3-050/CF) a diferentes concentraciones, y la cantidad de antígeno unido al anticuerpo en un tampón de migración (tampón de fosfato, SP20 al 0,05 %) se midió a lo largo del tiempo. La cantidad medida se analizó con un software dedicado (BIAevaluation Versión 4.1, GE Healthcare Corporation) y se calculó una constante de disociación.

Como resultado, se descubrió que el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 se habían unido al antígeno recombinante de B7-H3 con una constante de disociación de 5,89 nM y 3,43 nM, respectivamente. A partir de estos resultados, se confirmó que el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 se unen al antígeno B7-H3 y que sus afinidades de unión eran sustancialmente iguales.

#### 8)-2 Actividad ADCP del anticuerpo cM30

Se aislaron células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de un sujeto sano de acuerdo con procedimientos comunes y se suspendieron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (Invitrogen Corporation) y a continuación se sembraron en un matraz. Las células se cultivaron durante una noche en una incubadora de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante del cultivo se retiró, y a las células unidas al matraz, se les añadió RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % suplementado con M-CSF y GM-CSF (PeproTech, Inc.), y las células se cultivaron durante 2 semanas. Las células se separaron con TrypLE y se recolectaron. A continuación, las células se añadieron a una placa de 24 pocillos a 500 µl/pocillo (1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) y se cultivaron durante una noche a 37 °C. Las células preparadas de este modo se usaron como células efectoras.

El etiquetado de las células NCI-H322 que se usarán como células diana se realizó usando el kit de etiquetado con colorante PKH26 (Sigma Co., Ltd.). Las células diana se desprendieron con TrypLE y se lavaron dos veces con PBS. Las células se suspendieron en diluyente C a 1 x 10<sup>7</sup> células/ml. Se diluyó material colorante PKH26 (1 mM) hasta 8 µM con diluyente C, e inmediatamente después, se le añadió la solución colorante diluida en una cantidad igual a la de la suspensión celular. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se le añadió 1 ml de suero, y además, se le añadió un medio con suero, y se realizó el lavado dos veces.

Cada uno del anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 se diluyó a 20 µg/ml con una solución de cultivo. Posteriormente, las células diana se dispensaron a 2 x 10<sup>6</sup> células/100 µl/tubo y se mezclaron. La mezcla resultante se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se retiró, y las células se lavaron dos veces con una solución de cultivo y se suspendieron en 500 µl de una solución de cultivo. El sobrenadante se retiró de las células efectoras, y las células que habían sido tratadas con el anticuerpo y suspendidas en la solución de cultivo se añadieron a la misma y se mezclaron con la misma. A continuación, las células se cultivaron durante 3 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Seguidamente, las células se separaron con tripsina-EDTA y se recogieron. A las células recogidas, se les añadió un anticuerpo anti-CD11b de ratón etiquetado con FITC (Becton, Dickinson and Company, Ltd.), y la mezcla resultante se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se retiró y las células se lavaron dos veces con una solución de cultivo. Las células recogidas se suspendieron en 300 µl de un medio de cultivo y se analizaron mediante FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company, Ltd.). En los macrófagos positivos para CD11b, se evaluó una fracción positiva para PKH26 como células positivas para fagocitosis.

Como resultado, tal y como se muestra en la figura 8, cuando el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 se añadieron a 10 µg/ml, la fagocitosis de las células NCI-H322 por los macrófagos se indujo al 33 ± 1 % y 35 ± 2 %, respectivamente. Por consiguiente, se demostró que el anticuerpo cM30 tiene una actividad ADCP contra las células NCI-H322 de la misma manera que el anticuerpo M30. Se obtuvo un resultado experimental similar también para una actividad ADCP contra células MDA-MB-231 (ATCC).

#### 8)-3 Efecto antitumoral in vivo del anticuerpo cM30

Se desprendieron células MDA-MB-231 de un matraz de cultivo mediante un tratamiento con tripsina, y a continuación se suspendieron en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (Invitrogen Corporation), seguido de centrifugación y el sobrenadante se retiró. Las células se lavaron dos veces con el mismo medio, y a continuación se suspendieron en matriz de membrana basal BD Matrigel (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.). A continuación, las células se implantaron por vía subcutánea en la región axilar de cada ratón (CB17/Icr-Prkdc[scid]/CrIcrlj, Charles River Laboratories Japan, Inc.) a las 6 semanas de edad a una dosis de 5 x 10<sup>6</sup> células/ratón. El día de la implantación se tomó como el día 0, y los días 14, 21, 28, 35 y 42, el anticuerpo M30, o el anticuerpo cM30 se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 500 µg/ratón (aproximadamente 25 mg/kg). El volumen tumoral se midió los días 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 42, 46, 49 y 52, y se examinó el efecto antitumoral de la administración del anticuerpo.

Como resultado, en los grupos de administración de anticuerpo M30 y cM30, el crecimiento tumoral se suprimió significativamente en comparación con el grupo no tratado en el que no se administró el anticuerpo. Los valores P para el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 en comparación con el grupo no tratado en términos del peso del tumor

en el día 52 fueron ambos  $P < 0,001$ . Los valores  $P$  se calcularon usando la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

- Además, la relación de inhibición del crecimiento tumoral ( $= 100 - (\text{volumen tumoral promedio en el grupo de administración de anticuerpos}) / (\text{volumen tumoral promedio en el grupo no tratado}) \times 100$ ) el día 52 fue del 71,3 % en el caso del anticuerpo M30 y el 71,7 % en el caso del anticuerpo cM30. Por consiguiente, se observó que el anticuerpo cM30 tiene un efecto antitumoral muy fuerte in vivo de la misma manera que el anticuerpo M30 (figura 9).

### **Ejemplo 9. Diseño de anticuerpo humanizado de anticuerpo #M30 de ratón anti-B7-H3 humana**

9)-1 Diseño del anticuerpo M30 humanizado

9)-1-1 Modelado molecular de regiones variables de M30

- 10 El modelado molecular de las regiones variables de M30 se realizó de acuerdo con un procedimiento generalmente conocido como modelado por homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Las secuencias primarias (estructuras tridimensionales derivadas de las estructuras cristalinas de rayos X disponibles) de las regiones variables de inmunoglobulina humana registradas en Protein Data Bank (Nuc. Acids Res. 35, D301-D303 (2007)) se compararon con las regiones variables de M30 determinadas en el ejemplo 6-3).

- 15 Como resultado, se seleccionó 3BKY como una secuencia que tiene la homología de secuencia más alta con la región variable de cadena ligera de M30 entre los anticuerpos que tienen una delección similar en el marco. Además, se seleccionó 3DGG como una secuencia que tiene la homología de secuencia más alta con la región variable de cadena pesada de M30.

- 20 La estructura tridimensional de una región marco se preparó basándose en un "modelo de marco" combinando las coordenadas de 3BKY correspondientes a la cadena ligera de M30 con las coordenadas de 3DGG correspondientes a la cadena pesada de M30. En cuanto a las CDR de M30, como las coordenadas que definen las conformaciones más similares a las de CDRH1 (SEQ ID NO: 92), CDRH2 (SEQ ID NO: 93), CDRH3 (SEQ ID NO: 94), CDRL1 (SEQ ID NO: 95), CDRL2 (SEQ ID NO: 96) y CDRL3 (SEQ ID NO: 97) de acuerdo con la clasificación de Thornton y col. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)) y se seleccionaron las reglas H3 (FEBS letters 399, 1-8 (1996)), 2HOJ, 1BBD, 1Q90, 2FBJ, 1LNK y 1TET, respectivamente, y se incorporaron en el modelo de marco.

Finalmente, para obtener un posible modelo molecular de la región variable de M30 en términos de energía, se realizó un cálculo de energía para excluir el contacto interatómico desfavorable. El procedimiento anterior se llevó a cabo usando el programa de predicción de la estructura terciaria de proteínas disponible en el mercado Prime y el programa de búsqueda de coordenadas MacroModel (Schrodinger, LLC).

- 30 9)-1-2 Diseño de la secuencia de aminoácidos de M30 humanizado

Se construyó un anticuerpo M30 humanizado de acuerdo con un procedimiento generalmente conocido como injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86, 10029-10033 (1989)).

- 35 Se seleccionó un anticuerpo aceptor basándose en la homología de aminoácidos dentro de la región marco. La secuencia de la región marco de M30 se comparó con todas las secuencias marco humanas en la Base de Datos Kabat (Nuc. Acids Res. 29, 205-206 (2001)) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo mAb49'CL (GenBank en NCBI: D16838.1 y D16837.1) como un aceptor basándose en una homología de secuencia del 70 % en la región marco.

- 40 Los restos de aminoácidos en la región marco de mAb49'CL se alinearon con los restos de aminoácidos de M30, y se identificaron las posiciones en las que se usaron diferentes aminoácidos. Las posiciones de estos restos se analizaron usando el modelo tridimensional de M30 construido anteriormente. A continuación, los restos donadores que se injertan sobre el aceptor se seleccionaron de acuerdo con los criterios proporcionados por Queen y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86, 10029-10033 (1989)). Transfiriendo algunos restos donadores seleccionados al anticuerpo aceptor, se construyeron secuencias de anticuerpo M30 humanizado tal como se describe en el siguiente ejemplo.

- 45 9)-2 Humanización de la cadena pesada de M30

9)-2-1 Cadena pesada de tipo M30-H1:

- 50 Una cadena pesada de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 35 (alanina), 39 (metionina), 57 (lisina), 59 (lisina), 67 (isoleucina), 86 (lisina), 87 (alanina), 89 (glutamina), 91 (serina), 93 (lisina), 95 (serina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 63 en el listado de secuencias con glutamina, valina, alanina, valina, lisina, serina, valina, arginina, alanina, metionina, arginina, valina, isoleucina, alanina, ácido glutámico, treonina, arginina, treonina, leucina y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo M30-H1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H1 se representa mediante la SEQ ID NO: 85.

9)-2-2 Cadena pesada de tipo M30-H2:

5 Una cadena pesada de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 35 (alanina), 39 (metionina), 57 (lisina), 59 (lisina), 86 (lisina), 87 (alanina), 89 (glutamina), 91 (serina), 93 (lisina), 95 (serina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 63 en el listado de secuencias con glutamina, valina, alanina, valina, lisina, serina, valina, arginina, alanina, arginina, valina, isoleucina, alanina, ácido glutámico, treonina, arginina, treonina, leucina y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo M30-H2".

10 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H2 se representa mediante la SEQ ID NO: 87.

9)-2-3 Cadena pesada de tipo M30-H3:

15 Una cadena pesada de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 35 (alanina), 39 (metionina), 59 (lisina), 89 (glutamina), 91 (serina), 93 (lisina), 95 (serina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 63 en el listado de secuencias con valina, alanina, valina, lisina, serina, valina, alanina, isoleucina, alanina, ácido glutámico, treonina, arginina, treonina, leucina y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo M30-H3".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H3 se representa mediante la SEQ ID NO: 89.

9)-2-4 Cadena pesada de tipo M30-H4:

20 Una cadena pesada de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 35 (alanina), 39 (metionina), 59 (lisina), 95 (serina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 63 en el listado de secuencias con valina, alanina, valina, lisina, serina, valina, alanina, treonina, arginina, treonina, leucina y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo M30-H4".

25 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H4 se representa mediante la SEQ ID NO: 91.

9)-3 Humanización de la cadena ligera de M30

9)-3-1 Cadena ligera de tipo M30-L1:

30 Una cadena ligera de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 21 (glutamina), 25 (serina), 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62 (serina), 64 (lisina), 65 (prolina), 66 (triptófano), 77 (valina), 89 (serina), 90 (tirosina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina) y 125 (leucina) de la cadena ligera de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias con ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, fenilalanina, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina e isoleucina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo M30-L1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L1 se representa mediante la SEQ ID NO: 71.

9)-3-2 Cadena ligera de tipo M30-L2:

40 Una cadena ligera de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 21 (glutamina), 25 (serina), 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62 (serina), 64 (lisina), 65 (prolina), 77 (valina), 89 (serina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina) y 125 (leucina) de la cadena ligera de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias con ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina e isoleucina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo M30-L2".

45 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L2 se representa mediante la SEQ ID NO: 73.

9)-3-3 Cadena ligera de tipo M30-L3:

50 Una cadena ligera de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 62 (serina), 65 (prolina), 77 (valina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina) y 125 (leucina) de la cadena ligera de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias con alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, alanina, leucina, isoleucina, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina

e isoleucina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo M30-L3".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L3 se representa mediante la SEQ ID NO: 75.

9)-3-4 Cadena ligera de tipo M30-L4:

5 Una cadena ligera de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 21 (glutamina), 25 (serina), 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62 (serina), 64 (lisina), 66 (triptófano), 77 (valina), 89 (serina), 90 (tirosina), 91 (serina), 96 (arginina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina) y 125 (leucina) de la cadena ligera de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias con ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, fenilalanina, treonina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina e isoleucina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo M30-L4".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L4 se representa mediante la SEQ ID NO: 77.

9)-3-5 Cadena ligera de tipo M30-L5:

15 Una cadena ligera de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 62 (serina), 77 (valina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina) y 125 (leucina) de la cadena ligera de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias con alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, alanina, isoleucina, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina e isoleucina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo M30-L5".

20 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L5 se representa mediante la SEQ ID NO: 79.

9)-3-6 Cadena ligera de tipo M30-L6:

25 Una cadena ligera de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 21 (glutamina), 25 (serina), 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62 (serina), 64 (lisina), 66 (triptófano), 77 (valina), 89 (serina), 90 (tirosina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina) y 125 (leucina) de la cadena ligera de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias con ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, fenilalanina, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina e isoleucina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo M30-L6".

30 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L6 se representa mediante la SEQ ID NO: 81.

9)-3-7 Cadena ligera de tipo M30-L7:

35 Una cadena ligera de M30 humanizada diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 21 (glutamina), 25 (serina), 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62 (serina), 64 (lisina), 66 (triptófano), 77 (valina), 89 (serina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina) y 125 (leucina) de la cadena ligera de cM30 representada mediante la SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias con ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina e isoleucina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo M30-L7".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L7 se representa mediante la SEQ ID NO: 83.

40 **(Ejemplo 10) Producción de anticuerpo humanizado 10)-1 Construcción de vectores de expresión de cadena ligera de tipo M30-L1, M30-L2, M30-L3, M30-L4, M30-L5, M30-L6 y M30-L7**

Se sintetizaron ADN que comprenden un gen que codifica una región variable de cadena ligera de tipo M30-L1, M30-L2, M30-L3, M30-L4, M30-L5, M30-L6 o M30-L7 representada por los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 71, los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 73, los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 75, los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 77, los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 79, los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 81 o los números de aminoácidos 21 a 128 en la SEQ ID NO: 83 en el listado de secuencias (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service) basándose en las SEC ID NO: 70, 72, 74, 76, 78, 80 y 82 de acuerdo con las secuencias de nucleótidos correspondientes a las SEQ ID NO anteriores de acuerdo con las secuencias de aminoácidos. A continuación, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos escindiendo los ADN sintetizados con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado y quimérico universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, con lo que se construyeron los vectores de expresión de cadena ligera de tipo M30-L1, M30-L2, M30-L3, M30-L4, M30-L5, M30-L6 y M30-L7.

Los vectores de expresión obtenidos de este modo se denominaron "pEF6KCL/M30-L1", "pEF6KCL/M30-L2", "pEF6KCL/M30-L3", "pEF6KCL/M30-L4", "pEF6KCL/M30-L5", "pEF6KCL/M30-L6" y "pEF6KCL/M30-L7", respectivamente.

#### 10)-2 Construcción de vectores de expresión de cadena pesada de tipo M30-H1, M30-H2, M30-H3 y M30-H4

- 5 Se sintetizaron ADN que comprenden un gen que codifica una región variable de cadena pesada de tipo M30-H1, M30-H2, M30-H3 o M30-H4 representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 85, los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 87, los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 89 o los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 91 en el listado de secuencias (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service) basándose en las SEQ ID NO: 84, 86, 88 y 90 de acuerdo con las secuencias de nucleótidos correspondientes a las SEQ ID NO anteriores de acuerdo con las secuencias de aminoácidos. A  
10 continuación, se insertó cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos escindiendo los ADN sintetizados con la enzima de restricción BlnI en el vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, con lo que se construyeron los vectores de expresión de cadena pesada de tipo M30-H1, M30-H2, M30-H3 y M30-H4.
- 15 Los vectores de expresión obtenidos de este modo se denominaron "pEF1FCCU/M30-H1", "pEF1FCCU/M30-H2", "pEF1FCCU/M30-H3" y "pEF1FCCU/M30-H4", respectivamente.

#### 10)-3 Diseño del anticuerpo humanizado

- Se sembraron  $1,2 \times 10^9$  células de células FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) en la fase de crecimiento logarítmico en 1,2 l de medio de expresión FreeStyle 293 fresco (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1  
20 hora mediante agitación a 90 rpm a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, ase suspendieron un vector de expresión de cadena pesada (0,4 mg) y un vector de expresión de cadena ligera (0,8 mg) preparados con el kit PureLink HiPure Plasmid (Invitrogen Corporation) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. A continuación, se añadieron 20 ml de líquido mixto de vectores de expresión/Opti-Pro SFM obtenido a 20 ml del  
25 líquido mixto de polietilimina/Opti-Pro SFM obtenido, y la mezcla resultante se agitó suavemente y a continuación se dejó reposar durante 5 minutos. Seguidamente, la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F, y se realizó cultivo en agitación a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 8 %. El sobrenadante del cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec n.º CCS-045-E1H).

- Un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L1 se denominó "M30-H1-L1", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L2 se denominó "M30-H1-L2", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L3 se denominó "M30-H1-L3", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L4 se denominó "M30-H1-L4", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H4 y pEF6KCL/M30-L1 se denominó "M30-H4-L1", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H4 y pEF6KCL/M30-L2 se denominó "M30-H4-L2", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H4 y pEF6KCL/M30-L3 se denominó "M30-H4-L3", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H4 y pEF6KCL/M30-L4 se denominó "M30-H4-L4", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L5 se denominó "M30-H1-L5", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L6 se denominó "M30-H1-L6" y un anticuerpo humanizado de M30 obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L7 se denominó "M30-H1-L7".

#### 10)-4 Purificación del anticuerpo humanizado

- 45 El sobrenadante de cultivo obtenido en el ejemplo 10)-3 se purificó mediante un procedimiento de dos etapas que incluía cromatografía de afinidad con rProtein A (a de 4 a 6 °C) e hidroxapatita cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de intercambio de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad con rProtein A y después de la purificación con hidroxapatita cerámico a temperatura ambiente.

- En primer lugar, se aplicaron de 1100 a 1200 ml del sobrenadante de cultivo a MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectadas en serie) equilibrado con PBS. Después de que toda la solución de cultivo se vertió en la columna, la columna se lavó con de 15 a 30 ml de PBS. Posteriormente, la elución se realizó con una solución de hidrocloreuro de arginina 2 M (pH 4,0) y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna de desalación (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas de desalación HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), con lo que el  
55 tampón se intercambió con un tampón que contenía fosfato de sodio 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5.

Además, la solución de anticuerpo sometida a intercambio de tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., Bio-Scale CHT2-1 columna de hidroxapatita (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. A continuación, se realizó

una elución del gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo.

5 La fracción se aplicó a una columna de desalación (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas de desalación HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), con lo que el líquido se intercambiaba con CBS (que contenía tampón citrato 10 mM y cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0).

Finalmente, la solución resultante se concentró usando el dispositivo de filtro de UF centrífugo VIVASPIN 20 (peso molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 4 °C), y la concentración de IgG se ajustó a 1,0 mg/ml o más, y la solución obtenida de este modo se usó como muestra purificada.

10)-5 Propiedad de unión del anticuerpo humanizado al antígeno B7-H3

10 La propiedad de unión del anticuerpo M30 humanizado a B7-H3 humana que es un antígeno se midió mediante un dispositivo de resonancia del plasmón superficial (SPR) (Biacore, Inc.). De acuerdo con procedimientos comunes, un anticuerpo anti-IgG humana se inmovilizó en un chip sensor, y a continuación, cada una de las muestras purificadas de los anticuerpos M30 humanizados obtenidos en el anterior 10)-4 se le unió. Seguidamente, se añadió un polipéptido del dominio extracelular del antígeno variante 2 de B7-H3 (fabricado por R&D Systems, Inc., n.º 2318-B3-050/CF) a diferentes concentraciones, y la cantidad de antígeno unido al anticuerpo en un tampón de migración (tampón de fosfato, SP20 al 0,05 %) se midió a lo largo del tiempo. La cantidad medida se analizó con un software dedicado (BIAevaluation) y se calculó una constante de disociación (Kd [M]). La medición se realizó usando el anticuerpo cM30 como control positivo para cada operación de medición. Los resultados son tal como se muestran en la tabla 3. Todos los anticuerpos M30 humanizados presentaban actividad de unión contra el antígeno B7-H3.

20

[Tabla 3]

	Kd[M]
M30-H1-L1	8,7E-08
M30-H1-L2	1,0E-07
M30-H1-L3	1,0E-07
M30-H1-L4	1,6E-08
M30-H4-L1	1,3E-07
M30-H4-L2	1,4E-07
M30-H4-L3	1,6E-07
M30-H4-L4	1,2E-08
M30-H1-L5	1,9E-09
M30-H1-L6	3,4E-09
M30-H1-L7	2,7E-09
cM30	7,3E-10

#### **Ejemplo 11. Medición de actividades inhibitoras competitivas del anticuerpo cM30 y el anticuerpo M30 humanizado contra el anticuerpo M30 para la unión al antígeno B7-H3**

25 Las actividades inhibitoras competitivas del anticuerpo cM30 y el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) contra el anticuerpo M30 para la unión a la variante 1 y la variante 2 de B7-H3 se midieron mediante el siguiente procedimiento.

30 Usando el kit de biotilación EZ-Link Sulfo-NHS-LC (fabricado por Thermo Scientific Corporation, n.º 21435) y de acuerdo con el protocolo adjunto, se biotinaron los respectivos anticuerpos monoclonales de ratón M30 (en lo sucesivo, los respectivos anticuerpos M30 biotinilados se denominaron "bM30"). Además, como un tampón para usar en el siguiente procedimiento ELISA, se usó BD OPTI EIA (BD Biosciences, Inc., n.º 550536) en todos los casos.

35 Cada uno del polipéptido del dominio extracelular del antígeno variante 1 de B7-H3 (fabricado por R&D Systems, Inc., n.º 1949-B3-050/CF) y el polipéptido del dominio extracelular del antígeno variante 2 de B7-H3 (fabricado por R&D Systems, Inc., n.º 2318-B3-050/CF) se diluyó a 0,5 µg/ml con un tampón de revestimiento y la solución resultante se dispensó a 100 µl/pocillo en una inmunoplaqueta (fabricada por Nunc, Inc., n.º 442404). A continuación, la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C, con lo que la proteína se adsorbió a la placa. Al día siguiente, se dispensó un diluyente de ensayo a 200 µl/pocillo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas.

Después de retirar la solución en cada pocillo, una solución mixta del anticuerpo biotinilado a 5 µg/ml y un anticuerpo no etiquetado a cada concentración (0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, o 125 µg/ml) se dispensó a 100

µl/pocillo en un diluyente de ensayo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después de que cada pocillo se lavó dos veces con un tampón de lavado, se añadió un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, n.º RPN1231V) diluido hasta 500 veces con un diluyente de ensayo a 100 µl/pocillo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después de retirar la solución en cada pocillo y de que cada pocillo se lavó dos veces con un tampón de lavado, se añadió una solución de sustrato a 100 µl/pocillo, y se dejó continuar una reacción de desarrollo de color mientras se agitaba la mezcla de reacción. Después de completar el desarrollo del color, se añadió un tampón de bloqueo a 100 µl/pocillo para detener la reacción de desarrollo de color. A continuación, se midió una absorbancia a 450 nm usando un lector de placas.

Como resultado, la absorbancia del pocillo al que se añadió bM30 solo fue de  $2,36 \pm 0,05$  (media  $\pm$  desviación estándar ( $n=12$ )) en la placa a la que se unió el polipéptido del dominio extracelular de la variante 1 de B7-H3, y  $1,90 \pm 0,20$  (media  $\pm$  desviación estándar ( $n=12$ )) en la placa a la que se unió el polipéptido del dominio extracelular de la variante 2 de B7-H3.

Las absorbancias en los gráficos de la figura 10 se expresan, cada una, como una media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). La IgG de control no inhibió la unión de bM30 a B7-H3.

Por otra parte, se demostró que la unión de bM30 a B7-H3 es inhibida por el propio anticuerpo M30, el anticuerpo cM30, que es un anticuerpo quimérico del anticuerpo M30, y el M30-H1-L4, que es un anticuerpo humanizado, tanto en la placa a la que estaba unido el polipéptido del dominio extracelular de la variante 1 de B7-H3 como en la placa a la que estaba unido el polipéptido del dominio extracelular de la variante 2 de B7-H3.

Es decir, se demostró que el anticuerpo cM30 y el anticuerpo humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) reconocen el mismo epítipo del antígeno B7-H3 que el anticuerpo M30.

#### **Ejemplo 12. Actividad del anticuerpo M30 humanizado**

##### 12)-1 Actividad ADCP del anticuerpo M30 humanizado

Se aislaron PBMC de un sujeto sano de acuerdo con procedimientos comunes y se suspendieron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % y a continuación se sembraron en un matraz. Las células se cultivaron durante una noche en una incubadora de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante del cultivo se retiró, y a las células unidas al matraz, se les añadió RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % suplementado con M-CSF y GM-CSF (PeproTech, Inc.), y las células se cultivaron durante 2 semanas. Las células se separaron con TrypLE y se recolectaron. A continuación, las células se añadieron a una placa de 24 pocillos a 500 µl/pocillo ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) y se cultivaron durante una noche a 37 °C. Las células preparadas de este modo se usaron como células efectoras.

El etiquetado de las células NCI-H322 que se usarán como células diana se realizó usando el kit de etiquetado con colorante PKH26 (Sigma Co., Ltd.). Las células diana se desprendieron con TrypLE y se lavaron dos veces con PBS. Las células se suspendieron en diluyente C a  $1 \times 10^7$  células/ml. Se diluyó material colorante PKH26 (1 mM) hasta 8 µM con diluyente C, e inmediatamente después, se le añadió la solución colorante diluida en una cantidad igual a la de la suspensión celular. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se le añadió 1 ml de suero, y además, se le añadió un medio con suero, y se realizó el lavado dos veces.

Cada uno del anticuerpo M30, el anticuerpo cM30 y el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) se diluyó a 20 µg/ml con RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (Invitrogen Corporation). Posteriormente, las células diana (células NCI-H322) se dispensaron a  $2 \times 10^6$  células/100 µl/tubo y se mezclaron. La mezcla resultante se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se retiró, y las células se lavaron dos veces con una solución de cultivo y se suspendieron en 500 µl de una solución de cultivo.

El sobrenadante se retiró de las células efectoras, y las células que habían sido tratadas con el anticuerpo M30, el anticuerpo cM30 o el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) y suspendidas en la solución de cultivo se añadieron a la misma y se mezclaron con la misma. A continuación, las células se cultivaron durante 3 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub>.

Siguientemente, las células se separaron con tripsina-EDTA y se recogieron.

A las células recogidas, se les añadió un anticuerpo anti-CD11b de ratón etiquetado con FITC (Becton, Dickinson and Company, Ltd.), y la mezcla resultante se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos.

El sobrenadante se retiró y las células se lavaron dos veces con una solución de cultivo.

Las células recogidas se suspendieron en 300 µl de un medio de cultivo y se analizaron mediante FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company, Ltd.). En los macrófagos positivos para CD11b, se evaluó una fracción positiva para PKH26 como células positivas para fagocitosis.



Los resultados se muestran en la figura 11.

En el grupo con la adición del anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4), se observó la actividad ADCP contra las células NCI-H322 de la misma manera que en los grupos con la adición del anticuerpo M30 o el anticuerpo cM30.

5 12)-2 Actividad ADCC del anticuerpo M30 humanizado

Se aislaron PBMC de un sujeto sano de acuerdo con procedimientos comunes y se suspendieron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % y a continuación se sembraron en un matraz. Las células se cultivaron durante una noche en una incubadora de CO<sub>2</sub>.

10 Las células flotantes se recogieron, seguido de un procedimiento de lavado, y las células resultantes se usaron como linfocitos de la sangre periférica (PBL). Los PBL obtenidos se suspendieron en RPMI 1640 libre de fenol rojo (fabricado por Invitrogen Corporation) que contenía suero fetal bovino al 10 % (fabricado por Invitrogen Corporation) (en adelante abreviado como "medio de ADCC") y la suspensión celular se hizo pasar a través de un filtro celular (tamaño de poro: 40 µm, fabricado por BD Biosciences, Ltd.). A continuación, las células viables se contaron mediante un ensayo de exclusión con colorante azul de tripano. Después de que la suspensión de PBL se centrifugó, se retiró el medio, y las células se resuspendieron en el medio de ADCC a una densidad celular viable de 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y se usaron como células efectoras.

20 Las células NCI-H322 se trataron con tripsina, y las células tratadas se lavaron con RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % y a continuación se resuspendieron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10 %. Las células (4 x 10<sup>6</sup> células) se mezclaron con cromo-51 (5550 kBq) se esterilizaron a través de un filtro de 0,22 µm y se realizó el etiquetado durante 1 hora en las condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células etiquetadas se lavaron tres veces con el medio de ADCC y las células se resuspendieron a 2 x 10<sup>5</sup> células/ml en el medio de ADCC y se usaron como células diana.

25 Las células diana a una densidad celular de 2 x 10<sup>5</sup> células/ml se dispensaron a 50 µl/pocillo en una microplaca de 96 pocillos de fondo en forma de U. Se les añadieron 50 µl del anticuerpo cM30 y los anticuerpos M30 humanizados (M30-H1-L4, M30-H4-L4, M30-H1-L5, M30-H1-L6 y M30-H1-L7), se diluyeron con el medio de ADCC de modo que la concentración final del anticuerpo después de añadir las células efectoras fuera de 1, 10, 100 o 1000 ng/ml. A continuación, se añadieron 100 µl de las células efectoras a una densidad celular de 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, y las células se cultivaron durante 4 horas en las condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. El sobrenadante se recogió en un LumaPlate (fabricado por PerkinElmer, Inc.), y la radiación gamma emitida a partir del mismo se midió usando un contador gamma. El porcentaje de lisis celular causado por la actividad ADCC se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Porcentaje de lisis celular (\%)} = (A-B) / (C-B) \times 100$$

A: Recuento de radiación procedente del pocillo de muestra

35 B: Recuento promedio de emisión de radiación espontánea (procedente de pocillos a los que no se añadieron el anticuerpo y las células efectoras) (n=3). Se realizó el mismo procedimiento que para el pocillo de muestra, excepto que el medio de ADCC se añadió en una cantidad de 50 µl en el momento de la adición del anticuerpo y en una cantidad de 100 µl en el momento de la adición de las células efectoras.

40 C: Recuento promedio de emisión de radiación máxima (procedente pocillos en los que las células diana se disolvieron con un tensioactivo) (n=3). Se realizó el mismo procedimiento que para el pocillo de muestra, excepto que se añadieron 50 µl del medio de ADCC en el momento de la adición del anticuerpo y se añadieron 100 µl del medio de ADCC que contenía Triton X-100 al 2 % (v/v) en el momento de la adición de las células efectoras.

Los resultados se muestran en la tabla 4, y la figura 12.

Los datos mostrados son un promedio de mediciones por triplicado, y las barras de error representan desviaciones estándar. El valor P se calculó usando la prueba de la t de Student.

45 En el grupo con la adición del anticuerpo M30-H1-L4, se observó la actividad ADCC de la misma manera que en los grupos con la adición del anticuerpo cM30. También se observó que otros anticuerpos M30 humanizados (M30-H4-L4, M30-H1-L5, M30-H1-L6 y M30-H1-L7) tenían actividad ADCC de la misma manera.

[Tabla 4]

	1 ng/ml		10 ng/ml		100 ng/ml		1000 ng/ml	
	Promedio (%)	Desviación estándar	Promedio (%)	Desviación estándar	Promedio (%)	Desviación estándar	Promedio (%)	Desviación estándar
IgG humana	3,8	1,6	6,8	1,5	3,9	1,4	6,5	0,5
cM30	11,1	1,2	40,5	2,7	84,3	2,3	88,2	4,0
M30-H1-L4	11,5	1,0	43,1	0,1	83,6	0,7	84,7	1,0

(continuación)

	1 ng/ml		10 ng/ml		100 ng/ml		1000 ng/ml	
	Promedio (%)	Desviación estándar	Promedio (%)	Desviación estándar	Promedio (%)	Desviación estándar	Promedio (%)	Desviación estándar
M30-H4-L4	7,6	1,1	26,6	1,6	68,9	2,6	81,7	1,5
M30-H1-L5	9,6	1,1	30,5	2,0	67,8	5,0	78,8	3,0
M30-H1-L6	9,8	1,6	32,0	2,2	74,7	4,0	81,3	2,0
M30-H1-L7	8,3	0,7	29,4	0,7	71,7	2,0	80,7	0,7

## 12)-3 Efecto antitumoral in vivo del anticuerpo M30 humanizado

Se desprendieron células MDA-MB-231 de un matraz de cultivo mediante un tratamiento con tripsina, y a continuación se suspendieron en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (Life Technologies Corporation), seguido de centrifugación y el sobrenadante se retiró. Las células se lavaron dos veces con el mismo medio, y a continuación se suspendieron en matriz de membrana basal BD Matrigel (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.). A continuación, las células se implantaron por vía subcutánea en la región axilar de cada uno de un grupo de ratones (FOX CHASE SCID C.B.17/lcr-scld/scldJcl, CLEA Japan, Inc.) a las 6 semanas de edad a una dosis de  $5 \times 10^6$  células/ratón. El día de la implantación se tomó como el día 0, y los días 14, 21, 28, 35 y 42, el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 10, 1, 0,1 o 0,01 mg/kg (aproximadamente 200, 20, 2 o 0.2  $\mu$ g/ratón, respectivamente). El volumen tumoral se midió los días 14, 18, 21, 25, 28, 31, 35, 39, 42, 45 y 49, y se examinó el efecto antitumoral de la administración del anticuerpo.

Como resultado, en los grupos de administración del anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) a 10, 1 y 0,1 mg/kg, el crecimiento tumoral se suprimió significativamente en comparación con el grupo no tratado en el que no se administró el anticuerpo. En los grupos de administración del anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) a 10, 1 y 0,1 mg/kg, la relación de inhibición del crecimiento tumoral ( $= 100 - (\text{peso del tumor promedio en el grupo de administración del anticuerpo}) / (\text{peso del tumor promedio en el grupo no tratado}) \times 100$ ) en comparación con el grupo no tratado en términos del peso del tumor el día 49 fue del 67, 54 y 51 %, respectivamente, y los valores P fueron todos  $P < 0,0001$ . Los valores P se calcularon usando la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

Además, la relación de inhibición del crecimiento tumoral (%) ( $= 100 - (\text{volumen tumoral promedio en el grupo de administración del anticuerpo}) / (\text{volumen tumoral promedio en el grupo no tratado}) \times 100$ ) del anticuerpo M30-H1-L4 el día 49 en los grupos de administración a 10, 1, 0,1 y 0,01 mg/kg fue del 84, 68, 61 y 30 %, respectivamente. Por consiguiente, se observó que el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) tenía un efecto antitumoral muy fuerte in vivo de la misma manera que el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30, y se confirmó que el efecto se exhibía en forma de respuesta a la dosis (figura 38).

**Aplicabilidad industrial**

El anticuerpo anti-B7-H3 de la invención tiene actividad antitumoral, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H3 puede ser un agente anticanceroso.

## Observaciones del listado de secuencias

- 30 SEQ ID NO: 1: cebador de PCR 1  
 SEQ ID NO: 2: Cebador de PCR 2  
 SEQ ID NO: 3: cebador promotor de CMV: cebador 3  
 SEQ ID NO: 4: cebador inverso de BGH: cebador 4  
 35 SEQ ID NO: 5: secuencia de nucleótidos de la variante 1 de B7-H3  
 SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácidos de la variante 1 de B7-H3  
 SEQ ID NO: 7: cebador de PCR 5  
 SEQ ID NO: 8: cebador de PCR 6  
 SEQ ID NO: 9: secuencia de nucleótidos de la variante 2 de B7-H3  
 40 SEQ ID NO: 10: secuencia de aminoácidos de la variante 2 de B7-H3  
 SEQ ID NO: 11: cebador de PCR 7  
 SEQ ID NO: 12: cebador de PCR 8  
 SEQ ID NO: 13: cebador de PCR 9  
 SEQ ID NO: 14: cebador de PCR 10  
 SEQ ID NO: 15: cebador de PCR 11  
 45 SEQ ID NO: 16: cebador de PCR 12  
 SEQ ID NO: 17: cebador de PCR 13  
 SEQ ID NO: 18: cebador de PCR 14  
 SEQ ID NO: 19: cebador de PCR 15

## ES 2 667 568 T3

SEQ ID NO: 20: secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgV1  
SEQ ID NO: 21: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV1  
SEQ ID NO: 22: secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgC1  
5 SEQ ID NO: 23: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgC1  
SEQ ID NO: 24: secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgV2  
SEQ ID NO: 25: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV2  
SEQ ID NO: 26: secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgC2  
SEQ ID NO: 27: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgC2  
10 SEQ ID NO: 28: secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgC1-V2-C2  
SEQ ID NO: 29: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgC1-V2-C2  
SEQ ID NO: 30: secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgV2-C2  
SEQ ID NO: 31: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV2-C2  
SEQ ID NO: 32: secuencia de nucleótidos de B7RP-1  
SEQ ID NO: 33: secuencia de aminoácidos de B7RP-1  
15 SEQ ID NO: 34: secuencia de nucleótidos de B7-H1  
SEQ ID NO: 35: secuencia de aminoácidos de B7-H1  
SEQ ID NO: 36: secuencia de nucleótidos de B7-DC  
SEQ ID NO: 37: secuencia de aminoácidos de B7-DC  
SEQ ID NO: 38: secuencia de nucleótidos de CD80  
20 SEQ ID NO: 39: secuencia de aminoácidos de CD80  
SEQ ID NO: 40: secuencia de nucleótidos de CD86  
SEQ ID NO: 41: secuencia de aminoácidos de CD86  
SEQ ID NO: 42: secuencia de nucleótidos de B7-H4  
SEQ ID NO: 43: secuencia de aminoácidos de B7-H4  
25 SEQ ID NO: 44: secuencia de aminoácidos N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo M30 de ratón  
SEQ ID NO: 45: secuencia de aminoácidos N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo M30 de ratón  
SEQ ID NO: 46: cebador de PCR 16  
SEQ ID NO: 47: cebador de PCR 17  
SEQ ID NO: 48: cebador de PCR 18  
30 SEQ ID NO: 49: cebador de PCR 19  
SEQ ID NO: 50: secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo M30  
SEQ ID NO: 51: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo M30  
SEQ ID NO: 52: secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo M30  
SEQ ID NO: 53: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo M30  
35 SEQ ID NO: 54: cebador de PCR 20  
SEQ ID NO: 55: cebador de PCR 21  
SEQ ID NO: 56: secuencia de ADN que codifica la señal secretora de la cadena  $\kappa$  humana, la región constante de la cadena  $\kappa$  humana y la señal adicional poli-A humana  
SEQ ID NO: 57: fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN que codifica aminoácidos de la  
40 secuencia señal y la región constante de IgG1 humana  
SEQ ID NO: 58: secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la cadena ligera de tipo quimera del anticuerpo M30  
SEQ ID NO: 59: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo quimera del anticuerpo M30  
SEQ ID NO: 60: cebador de PCR 22  
45 SEQ ID NO: 61: cebador de PCR 23  
SEQ ID NO: 62: secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la cadena pesada de tipo quimera del anticuerpo M30  
SEQ ID NO: 63: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo quimera del anticuerpo M30  
SEQ ID NO: 64: cebador de PCR 24  
50 SEQ ID NO: 65: cebador de PCR 25  
SEQ ID NO: 66: cebador de PCR 26  
SEQ ID NO: 67: cebador de PCR 27  
SEQ ID NO: 68: cebador de PCR 28  
SEQ ID NO: 69: cebador de PCR 29  
55 SEQ ID NO: 70: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L1  
SEQ ID NO: 71: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L1  
SEQ ID NO: 72: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L2  
SEQ ID NO: 73: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L2  
SEQ ID NO: 74: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L3  
60 SEQ ID NO: 75: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L3  
SEQ ID NO: 76: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L4  
SEQ ID NO: 77: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L4  
SEQ ID NO: 78: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L5  
SEQ ID NO: 79: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L5  
65 SEQ ID NO: 80: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L6  
SEQ ID NO: 81: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L6

SEQ ID NO: 82: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L7  
 SEQ ID NO: 83: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L7  
 SEQ ID NO: 84: secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo M30-H1  
 SEQ ID NO: 85: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H1  
 5 SEQ ID NO: 86: secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo M30-H2  
 SEQ ID NO: 87: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H2  
 SEQ ID NO: 88: secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo M30-H3  
 SEQ ID NO: 89: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H3  
 10 SEQ ID NO: 90: secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo M30-H4  
 SEQ ID NO: 91: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H4  
 SEQ ID NO: 92: secuencia de aminoácidos CDRH1 del anticuerpo M30  
 SEQ ID NO: 93: secuencia de aminoácidos CDRH2 del anticuerpo M30  
 SEQ ID NO: 94: secuencia de aminoácidos CDRH3 del anticuerpo M30  
 SEQ ID NO: 95: secuencia de aminoácidos CDRL1 del anticuerpo M30  
 15 SEQ ID NO: 96: secuencia de aminoácidos CDRL2 del anticuerpo M30  
 SEQ ID NO: 97: secuencia de aminoácidos CDRL3 del anticuerpo M30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Daiichi Sankyo Company, Limited  
 <120> Anticuerpo anti B7-H3  
 20 <130> DSPCT-FP1214  
 <150>\201 JP 2011-097645  
 <151>\201 2011-04-25  
 <150>\201 US 61/478878  
 <151>\201 2011-04-25  
 25 <160> 97  
 <170> PatentIn versión 3.4  
 <210> 1  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 <400> 1  
 ctataggggag acccaagctg gctagcatgc tgcgtcggcg gggcag 46  
 35 <210> 2  
 <211> 66  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> cebador de PCR  
 <400> 2  
 aacggggccct ctagactcga gcggccgctc aggcattttc ttgtccatca tcttctttgc 60  
 tgtcag 66  
 <210> 3  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 <400> 3

ES 2 667 568 T3

cgcaaatggg cggtaggcgt g 21

<210> 4  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 4  
 tagaaggcac agtcgagg 18

10 <210> 5  
 <211> 1815  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60

ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggacc ctgaagacc agtgggtggca 120

ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180

gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctgggtgca cagctttgct 240

gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300

gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 360

acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgcccg tcagcctgca ggtggccgct 420

ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480

gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtggt ctggcaggat 540

gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600

ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 660

ctggtgcgca acccctgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 720

agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccgggtgt ggcctagtg 780

ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag 840

ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc 900

cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacia 960

ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc 1020

ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgtc gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac 1080

tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 1140

atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg tgttctggca ggatgggagc 1200

ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt 1260

gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg 1320

cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1380

acattcccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg 1440

ctggtggccc tggcttctgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1500

15 gcaggagctg aggaccagga tggggagggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1560

ES 2 667 568 T3

aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cctgagcggc cgccactgtg 1620  
 ctggatatct gcagaattcc accacactgg actagtggat ccgagctcgg taccaagctt 1680  
 aagtttaaac cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg 1740  
 cccctcccc gtgccttctc tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata 1800  
 aaatgaggaa attgc 1815

<210> 6  
 <211> 534  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6

5

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

ES 2 667 568 T3

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

ES 2 667 568 T3

Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp  
 435 440 445

Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro  
 450 455 460

Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu  
 465 470 475 480

Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys  
 485 490 495

Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly  
 500 505 510

Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp  
 515 520 525

Asp Gly Gln Glu Ile Ala  
 530

5 <210> 7  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de PCR

10 <400> 7  
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatgctg cgtcggcggg gcagccctg 59

10 <210> 8  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 8  
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ggctatttct tgt 43

20 <210> 9  
 <211> 948  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9



ES 2 667 568 T3

```

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca      60
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccagggtcc ctgaagaccc agtgggtggca    120
ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg     180
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gatacctaac agctggtgca cagctttgct     240
gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg     300
gcacagggca acgcatccct gaggtctgag cgcgtgctg tggcggacga gggcagcttc     360
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgcccg tcagcctgca ggtggccgct     420
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg     480
gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgaggtggt ctggcaggat     540
gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccea cgagcagggc     600
ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc     660
ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag     720
cctatgacat tccccccaga ggcctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt     780
gcactgctgg tggccctggc tttcgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag     840
gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag     900
cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcc                    948

```

<210> 10  
 <211> 316  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

```

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1                               5                               10
                               15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
 20                               25                               30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
 35                               40                               45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50                               55                               60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65                               70                               75                               80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85                               90                               95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100                               105                               110

```

ES 2 667 568 T3

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp  
 115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys  
 130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr  
 145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val  
 165 170 175

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr  
 180 185 190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu  
 195 200 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn  
 210 215 220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln  
 225 230 235 240

Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser  
 245 250 255

Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg  
 260 265 270

Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln  
 275 280 285

Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His  
 290 295 300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala  
 305 310 315

<210> 11  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 11  
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cggagccctg gaggtccagg tc 52

10

<210> 12  
 <211> 55

# ES 2 667 568 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 5 <400> 12  
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgctccctac tcgaagccca gcatg 55  
  
 <210> 13  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 13  
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cggagccgtg gaggtccagg tc 52  
  
 15 <210> 14  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 14  
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgctccctac tcgaagccca gcatg 55  
  
 <210> 15  
 <211> 54  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 15  
 30 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcaggctatt tctgtccat catc 54  
  
 <210> 16  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 16  
 gggaatgtca taggctgccc ggccacctgc aggctgacgg cag 43  
  
 <210> 17  
 <211> 42  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 45 <400> 17  
 gggaatgtca taggctgccc tgtggggctt ctctggggtg tg 42  
  
 <210> 18  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

ES 2 667 568 T3

<220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 18  
 gggaatgtca taggctgccc ggccacctgc aggctgacgg cag 43

5 <210> 19  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 19  
 gggcagccta tgacattccc cccagag 27

15 <210> 20  
 <211> 576  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

ggagccctgg aggtccaggt ccctgaagac ccagtgggtg cactgggtgg caccgatgcc 60

accctgtgct gctccttctc ccctgagcct ggcttcagcc tggcacagct caacctcatc 120

tggcagctga cagataccaa acagctgggtg cacagctttg ctgagggcca ggaccagggc 180

agcgcctatg ccaaccgcac ggccctcttc ccggacctgc tggcacaggg caacgcatcc 240

ctgaggctgc agcgcgtgcg tgtggcggac gagggcagct tcacctgctt cgtgagcatc 300

cgggatttcg gcagcgtgctc cgtcagcctg caggtggccg ggcagcctat gacattcccc 360

ccagaggccc tgtgggtgac cgtggggctg tctgtctgtc tcattgcact gctggtggcc 420

ctggccttcg tgtgctggag aaagatcaaa cagagctgtg aggaggagaa tgcaggagct 480

gaggaccagg atggggaggg agaaggctcc aagacagccc tgcagcctct gaaacactct 540

gacagcaaag aagatgatgg acaagaaata gcctga 576

20 <210> 21  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

ES 2 667 568 T3

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

Gly Thr Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe  
 20 25 30

Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln  
 35 40 45

Leu Val His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala  
 50 55 60

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

Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys  
 85 90 95

Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val  
 100 105 110

Ala Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val  
 115 120 125

Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val  
 130 135 140

Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala  
 145 150 155 160

Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro  
 165 170 175

Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala  
 180 185 190

<210> 22  
 <211> 552  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 22

5

ES 2 667 568 T3

gctccctact cgaagcccag catgaccctg gagcccaaca aggacctgcg gccaggggac 60  
 acggtgacca tcacgtgctc cagctaccag ggctaccctg aggctgaggt gttctggcag 120  
 gatgggcagg gtgtgccctt gactggcaac gtgaccacgt cgcagatggc caacgagcag 180  
 ggcttgtttg atgtgcacag catcctgcgg gtgggtgctgg gtgcaaatgg cacctacagc 240  
 tgcttggtgc gcaaccccgt gctgcagcag gatgcgcaaca gctctgtcac catcacaccc 300  
 cagagaagcc ccacagggca gcctatgaca ttccccccag aggccctgtg ggtgaccctg 360  
 gggctgtctg tctgtctcat tgcactgctg gtggccctgg ctttcgtgtg ctggagaaa 420  
 atcaaacaga gctgtgagga ggagaatgca ggagctgagg accaggatgg ggagggagaa 480  
 ggctccaaga cagccctgca gcctctgaaa cactctgaca gcaaagaaga tgatggacaa 540  
 gaaatagcct ga 552

<210> 23  
 <211> 183  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 23

5

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

ES 2 667 568 T3

<210> 24  
 <211> 576  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 24

```

ggagccgtgg aggtccaggt ccctgaggac ccggtggtgg ccctagtggg caccgatgcc      60
accctgcgct gtccttctc ccccgagcct ggcttcagcc tggcacagct caacctcatc      120
tggcagctga cagacaccaa acagctggtg cacagtttca ccgaaggccg ggaccagggc      180
agcgcctatg ccaaccgcac ggccctcttc cgggacctgc tggcacaagg caatgcatcc      240
ctgaggctgc agcgcgtgcg tgtggcggac gagggcagct tcacctgctt cgtgagcatc      300
cgggatttcg gcagcgtgct cgtcagcctg caggtggccg ggcagcctat gacattcccc      360
ccagaggccc tgtgggtgac cgtggggctg tctgtctgtc tcattgcact gctggtggcc      420
ctggctttcg tgtgctggag aaagatcaaa cagagctgtg aggaggagaa tgcaggagct      480
gaggaccagg atggggaggg agaaggctcc aagacagccc tgcagcctct gaaacactct      540
gacagcaaag aagatgatgg acaagaaata gcctga                                576
    
```

<210> 25  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 25

```

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

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

Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln
                               35                               40                               45

Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala
50                               55                               60

Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser
65                               70                               75                               80
    
```

ES 2 667 568 T3

Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys  
 85 90 95

Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val  
 100 105 110

Ala Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val  
 115 120 125

Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val  
 130 135 140

Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala  
 145 150 155 160

Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro  
 165 170 175

Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala  
 180 185 190

<210> 26  
 <211> 534  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 26

gctccctact cgaagcccag catgaccctg gagcccaaca aggacctgcg gccaggggac 60

acggtgacca tcacgtgctc cagctaccgg ggctaccctg aggctgaggt gttctggcag 120

gatgggcagg gtgtgcccct gactggcaac gtgaccacgt cgcagatggc caacgagcag 180

ggcttgtttg atgtgcacag cgtcctgctg gtggtgctgg gtgcgaatgg cacctacagc 240

tgcttgggtg gcaaccccgt gctgcagcag gatgogcacg gctctgtcac catcacaggg 300

cagcctatga cattcccccc agaggccctg tgggtgaccg tggggctgtc tgtctgtctc 360

attgcactgc tgggtggccct ggctttcgtg tgctggagaa agatcaaaca gagctgtgag 420

gaggagaatg caggagctga ggaccaggat ggggaggag aaggctcaa gacagccctg 480

cagcctctga aacactctga cagcaaagaa gatgatggac aagaaatagc ctga 534

<210> 27  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 27



ES 2 667 568 T3

Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu  
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr  
 20 25 30

Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr  
 35 40 45

Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp  
 50 55 60

Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser  
 65 70 75 80

Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val  
 85 90 95

Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val  
 100 105 110

Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala  
 115 120 125

Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala  
 130 135 140

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

Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile  
 165 170 175

Ala

<210> 28  
 <211> 1188  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 28

5

ES 2 667 568 T3

gctccctact cgaagcccag catgaccctg gagcccaaca aggacctgcg gccaggggac 60  
acggtgacca tcacgtgctc cagctaccag ggctaccctg aggctgaggt gttctggcag 120  
gatgggcagg gtgtgccct gactggcaac gtgaccacgt cgagatggc caacgagcag 180  
ggcttgtttg atgtgcacag catcctgctg gtggtgctgg gtgcaaatgg cacctacagc 240  
tgcctggtgc gcaaccccgt gctgcagcag gatgcgcaca gctctgtcac catcacaccc 300  
cagagaagcc ccacaggagc cgtggaggtc caggtccctg aggacccggt ggtggccta 360  
  
gtgggcaccg atgccaccct gcgctgctcc ttctcccccg agcctggctt cagcctggca 420  
cagctcaacc tcactgtgca gctgacagac accaaacagc tgggtgcacag tttcaccgaa 480  
ggccgggacc agggcagcgc ctatgccaac cgcacggccc tcttcccgga cctgctggca 540  
caaggcaatg catccctgag gctgcagcgc gtgctgtggtg cggacgaggg cagcttcacc 600  
tgcttcgtga gcatccggga tttcggcagc gctgccgtca gcctgcaggt ggccgctccc 660  
tactcgaagc ccagcatgac cctggagccc aacaaggacc tgcggccagg ggacacggtg 720  
accatcacgt gctccagcta ccggggctac cctgaggctg aggtgttctg gcaggatggg 780  
caggggtgtgc ccctgactgg caacgtgacc acgtcgcaga tggccaacga gcagggcttg 840  
tttgatgtgc acagcgtcct gcgggtggtg ctgggtgcga atggcaccta cagctgcctg 900  
gtgcgcaacc ccgtgctgca gcaggatgag cacggctctg tcaccatcac agggcagcct 960  
atgacattcc ccccagaggc cctgtgggtg accgtggggc tgtctgtctg tctcattgca 1020  
ctgctggtgg ccctggcttt cgtgtgctgg agaaagatca aacagagctg tgaggaggag 1080  
aatgcaggag ctgaggacca ggatggggag ggagaaggct ccaagacagc cctgcagcct 1140  
ctgaaacact ctgacagcaa agaagatgat ggacaagaaa tagcctga 1188

<210> 29  
<211> 395  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 29

5

ES 2 667 568 T3

Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu  
 1 5 10 15

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

Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr  
 35 40 45

Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp  
 50 55 60

Val His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser  
 65 70 75 80

Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val  
 85 90 95

Thr Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val  
 100 105 110

ES 2 667 568 T3

Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg  
 115 120 125

Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu  
 130 135 140

Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu  
 145 150 155 160

Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro  
 165 170 175

Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg  
 180 185 190

Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe  
 195 200 205

Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro  
 210 215 220

Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val  
 225 230 235 240

Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe  
 245 250 255

Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser  
 260 265 270

Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg  
 275 280 285

Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro  
 290 295 300

Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro  
 305 310 315 320

Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val  
 325 330 335

Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys  
 340 345 350

Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp  
 355 360 365

ES 2 667 568 T3

Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser  
 370 375 380

Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala  
 385 390 395

5 <210> 30  
 <211> 873  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30  
 ggagccgtgg aggtccaggt ccctgaggac ccggtggtgg ccctagtggg caccgatgcc 60  
 accctgcgct gtccttctc ccccgagcct ggcttcagcc tggcacagct caacctcatc 120  
 tggcagctga cagacaccaa acagctggtg cacagtttca ccgaaggccg ggaccagggc 180  
 agcgcctatg ccaaccgcac ggcctcttc ccggacctgc tggcacaagg caatgcatcc 240  
 ctgaggctgc agcgcgtgcg tgtggcggac gagggcagct tcacctgctt cgtgagcatc 300  
 cgggatttcg gcagcgtgac cgtcagcctg caggtggccg ctccctactc gaagcccagc 360  
 atgaccctgg agcccaacaa ggacctgcgg ccaggggaca cggtgaccat cacgtgctcc 420  
 agtaccggg gctaccctga ggctgaggtg ttctggcagg atgggcaggg tgtgcccctg 480  
 actggcaacg tgaccacgtc gcagatggcc aacgagcagg gcttgtttga tgtgcacagc 540  
 gtctgcggg tgggtgctggg tgcgaatggc acctacagct gcctggtgcg caaccccgtg 600  
 ctgcagcagg atgcgcacgg ctctgtcacc atcacagggc agcctatgac attcccccca 660  
 gaggccctgt ggggtgaccgt ggggctgtct gtctgtctca ttgcaactgct ggtggccctg 720  
 gctttcgtgt gctggagaaa gatcaaacag agctgtgagg aggagaatgc aggagctgag 780  
 gaccaggatg gggagggaga aggctccaag acagccctgc agcctctgaa aactctgac 840  
 agcaaagaag atgatggaca agaaatagcc tga 873

10 <210> 31  
 <211> 290  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31  
 Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe  
 20 25 30  
 Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln

ES 2 667 568 T3

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

ES 2 667 568 T3

Ile Ala  
290

5 <210> 32  
<211> 909  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 32  
atgCGGctgg gcagtcctgg actgctcttc ctgctcttca gcagccttcg agctgatact 60  
caggagaagg aagtcagagc gatggtaggc agcgacgtgg agctcagctg cgcttgccct 120  
gaaggaagcc gttttgattt aaatgatggt tacgtatatt ggcaaaccag tgagtcgaaa 180  
accgtggtga cctaccacat cccacagAAC agctccttgg aaaacgtgga cagccgctac 240  
cggaaccgag ccctgatgtc accggccggc atgctgCGgg gcgacttctc cctgcgcttg 300  
ttcaacgtca cccccagga cgagcagaag tttcactgcc tggtgttgag ccaatccctg 360  
ggattccagg aggttttgag cgttgaggtt aactgcatg tggcagcaaa cttcagcgtg 420  
cccgtcgtca gcgcccccca cagcccctcc caggatgagc tcaccttcac gtgtacatcc 480  
ataaacggct accccaggcc caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg 540  
gaccaggctc tgcagaatga caccgtcttc ttgaacatgc ggggcttgta tgacgtggtc 600  
agcgtgctga ggatcgcacg gacccccagc gtgaacattg gctgctgcat agagaacgtg 660  
cttctgcagc agaacctgac tgtcggcagc cagacaggaa atgacatcgg agagagagac 720  
aagatcacag agaatccagt cagtaccggc gagaaaaacg cggccacgtg gagcatcctg 780  
gctgtcctgt gcctgcttgt ggtcgtggcg gtggccatag gctgggtgtg cagggaccga 840  
tgctccaac acagctatgc aggtgcctgg gctgtgagtc cggagacaga gctcaactggc 900  
cacgtttga 909

10 <210> 33  
<211> 302  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 33  
Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu  
1 5 10 15  
Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp  
20 25 30  
Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn  
35 40 45  
Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr

ES 2 667 568 T3

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



ES 2 667 568 T3

<211> 873  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

atgaggatat ttgctgtctt tatattcatg acctactggc atttgctgaa cgcatttact 60  
 gtcacgggttc ccaaggacct atatgtggtg gagtatggta gcaatatgac aattgaatgc 120  
 aaattcccag tagaaaaaca attagacctg gctgcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180  
 gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaaggttca gcatagtagc 240  
 tacagacaga gggcccggct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag 300  
 atcacagatg tgaattgca ggatgcaggg gtgtaccgct gcatgatcag ctatggtggt 360  
 gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaaat caaccaaga 420  
 attttggttg tggatccagt cacctctgaa catgaactga catgtcaggc tgagggctac 480  
 cccaaggccg aagtcactctg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540  
 accaccaatt ccaagagaga ggagaagctt ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600  
 acaacaacta atgagatddd ctactgcact tttaggagat tagatcctga ggaaaacat 660  
 acagctgaat tggatcatccc agaactacct ctggcacatc ctccaaatga aaggactcac 720  
 ttggttaattc tgggagccat cttattatgc cttggtgtag cactgacatt catcttccgt 780  
 ttaagaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aatgtggca tccaagatac aaactcaaag 840  
 5 aagcaaagtg atacacattt ggaggagacg taa 873

<210> 35  
 <211> 290  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 35

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

ES 2 667 568 T3

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn  
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr  
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val  
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val  
130 135 140

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

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser  
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn  
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr  
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu  
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His  
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys  
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu  
275 280 285

Glu Thr  
290

<210> 36  
<211> 909  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 36

ES 2 667 568 T3

atgctggctgg gcagtcctgg actgctcttc ctgctcttca gcagccttcg agctgatact 60  
 caggagaagg aagtcagagc gatggtaggc agcgacgtgg agctcagctg cgcttgccct 120  
 gaaggaagcc gttttgattt aatgatggtt tacgtatatt ggcaaaccag tgagtcgaaa 180  
 accgtggtga cctaccacat cccacagAAC agctccttgg aaaacgtgga cagccgctac 240  
 cggaaccgag ccctgatgtc accggccggc atgctgcggg gcgacttctc cctgcgcttg 300  
 ttcaacgtca cccccagga cgagcagaag tttcactgcc tgggtgtgag ccaatccctg 360  
 ggattccagg aggttttgag cgttgaggtt aactgcatg tggcagcaaa cttcagcgtg 420  
 cccgtcgtca gcgcccccca cagcccctcc caggatgagc tcaccttcac gtgtacatcc 480  
 ataaacggct accccaggcc caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg 540  
 gaccaggctc tgcagaatga caccgtcttc ttgaacatgc ggggcttgta tgacgtggtc 600  
 agcgtgctga ggatcgcacg gacccccagc gtgaacattg gctgctgcat agagaacgtg 660  
 cttctgcagc agaacctgac tgtcggcagc cagacaggaa atgacatcgg agagagagac 720  
 aagatcacag agaatccagt cagtaccggc gagaaaaacg cggccacgtg gagcatcctg 780  
 gctgtcctgt gcctgcttgt ggtcgtggcg gtggccatag gctgggtgtg cagggaccga 840  
 tgcctccaac acagctatgc aggtgcctgg gctgtgagtc cggagacaga gctcactggc 900  
 cacgtttga 909

<210> 37  
 <211> 302  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 37

Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu  
 1 5 10 15

Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp  
 20 25 30

Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn  
 35 40 45

Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr  
 50 55 60

Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr  
 65 70 75 80

Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe  
 85 90 95

ES 2 667 568 T3

Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His  
 100 105 110

Cys Leu Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val  
 115 120 125

Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser  
 130 135 140

Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser  
 145 150 155 160

Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp  
 165 170 175

Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn  
 180 185 190

Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr  
 195 200 205

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

Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp  
 225 230 235 240

Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr  
 245 250 255

Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala  
 260 265 270

Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly  
 275 280 285

Ala Trp Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Gly His Val  
 290 295 300

<210> 38  
 <211> 867  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 38

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60  
 cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120

ES 2 667 568 T3

gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180  
 caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240  
 atgaatatat ggcccagagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300  
 attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtggtg tgttctgaag 360  
 tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420  
 gacttccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480  
 atttgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540  
 gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600  
 agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660  
 ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720  
 gataacctgc tcccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 780  
 tgctgcctga cctactgctt tgcccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840  
 agaagggaaa gtgtacgccc tgtatag 867

<210> 39  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 39

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

ES 2 667 568 T3

	115		120		125														
Glu	His	Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr				
	130					135					140								
Pro	Ser	Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile				
145					150					155					160				
Ile	Cys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu				
				165					170					175					
Glu	Asn	Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp				
			180					185					190						
Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met				
		195					200					205							
Thr	Thr	Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg				
	210					215					220								
Val	Asn	Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro				
225					230					235					240				
Asp	Asn	Leu	Leu	Pro	Ser	Trp	Ala	Ile	Thr	Leu	Ile	Ser	Val	Asn	Gly				
				245					250					255					
Ile	Phe	Val	Ile	Cys	Cys	Leu	Thr	Tyr	Cys	Phe	Ala	Pro	Arg	Cys	Arg				
			260					265					270						
Glu	Arg	Arg	Arg	Asn	Glu	Arg	Leu	Arg	Arg	Glu	Ser	Val	Arg	Pro	Val				
		275					280					285							

<210> 40  
 <211> 990  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 40

5

ES 2 667 568 T3

atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60  
tctgggtgctg ctctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120  
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180  
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240  
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300  
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360  
attcgcaccc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420  
  
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480  
cacggttacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540  
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600  
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatggt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660  
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cttttctcta tagagcttga ggaccctcag 720  
cctccccag accacattcc ttggattaca gctgtacttc caacagttat tatatgtgtg 780  
atggttttct gtctaattct atggaaatgg aagaagaaga agcggcctcg caactcttat 840  
aaatgtggaa ccaacacaat ggagagggaa gagagtgaac agaccaagaa aagagaaaaa 900  
atccatatac ctgaaagatc tgatgaagcc cagcgtggtt ttaaaagttc gaagacatct 960  
tcatgcgaca aaagtgatac atgttttttag 990

<210> 41  
<211> 329  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 41

5

ES 2 667 568 T3

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

Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe  
 20 25 30

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln  
 35 40 45

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val  
 50 55 60

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser  
 65 70 75 80

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg  
 85 90 95

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile  
 100 105 110

His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser  
 115 120 125

Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile  
 130 135 140



ES 2 667 568 T3

Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile  
145 150 155 160

His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys  
165 170 175

Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn  
180 185 190

Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro  
195 200 205

Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys  
210 215 220

Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln  
225 230 235 240

Pro Pro Pro Asp His Ile Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val  
245 250 255

Ile Ile Cys Val Met Val Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys  
260 265 270

Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu  
275 280 285

Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro  
290 295 300

Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser  
305 310 315 320

Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr Cys Phe  
325

<210> 42  
<211> 849  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 42

atggcttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct 60  
ggagcaattg cactcatcat tggctttggt atttcagggg gacactccat cacagtcact 120  
actgtcgcct cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct 180  
gacatcaaac tttctgatat cgtgatacaa tggctgaagg aaggtgtttt aggcttggtc 240

ES 2 667 568 T3

catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tcggagcagg atgaaatggt cagaggccgg 300  
 acagcagtgt ttgctgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggtt gaaaaactgt 360  
 caactcacag atgctggcac ctacaaatgt tatatcatca cttctaaagg caaggggaat 420  
 gctaaccttg agtataaaac tggagccttc agcatgccgg aagtgaatgt ggactataat 480  
 gccagctcag agaccttgcg gtgtgaggct ccccgatggt tccccagcc cacagtggtc 540  
 tgggcatccc aagttgacca gggagccaac ttctcggaag tctccaatac cagctttgag 600  
 ctgaactctg agaatgtgac catgaaggtt gtgtctgtgc tctacaatgt tacgatcaac 660  
 aacacatact cctgtatgat tgaaaatgac attgccaaag caacagggga tatcaaagt 720  
 acagaatcgg agatcaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaaa ggcttctctg 780  
 tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg 840  
 ctaaaatag 849

<210> 43  
 <211> 282  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 43

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

ES 2 667 568 T3

130

135

140

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

Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln  
165 170 175

Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser  
180 185 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met  
195 200 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser  
210 215 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val  
225 230 235 240

Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser  
245 250 255

Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu  
260 265 270

Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys  
275 280

<210> 44  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

5

<400> 44

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

<210> 45  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

10

<400> 45

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

<210> 46  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador de PCR  
 <400> 46  
 aagaattcat ggaatggagt tggata 26  
 5 <210> 47  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 10 <400> 47  
 aagatatctc atttaccgg agtccgggag aa 32  
 <210> 48  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 <400> 48  
 aagaattcat ggatttctg gtcag 26  
 20 <210> 49  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 25 <400> 49  
 aagatatctt aacctcatt cctgttgaag ct 32  
 <210> 50  
 <211> 1413  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 30 <400> 50

ES 2 667 568 T3

atggaatgga gttggatatt tctctttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60  
 gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gtaaagcctg gggcttcagt gaagatgtcc 120  
 tgcaaggctt ctggatacac attcactaac tatgttatgc actgggtgaa gcagaagcct 180  
 gggcagggcc ttgagtggat tggatatatt aatccttaca atgatgatgt taagtacaat 240  
 gagaagttca aaggcaaggc cacacagact tcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300  
 gagctcagca gcctgacctc tgaggactct gcgggtctatt actgtgcaag atgggggtac 360  
 tacggtagtc ccttatacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 420  
 tcagccaaaa caacagcccc atcgggtctat ccactggccc ctgtgtgtgg agatacaact 480  
 ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc aagggttatt tccctgagcc agtgacctg 540  
 acctggaact ctggatccct gtccagtggc gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct 600  
 gacctctaca ccctcagcag ctcagtgact gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc 660  
 atcacctgca atgtggccca cccggcaagc agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc 720  
 agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt 780  
 ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc 840  
 cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc 900  
 tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca gctcagacac aaaccatag agaggattac 960  
 aacagtactc tccgggtggt cagtgccctc cccatccagc accaggactg gatgagtggc 1020  
 aaggagttca aatgcaaggt caacaacaaa gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc 1080  
 tcaaaacca aagggtcagt aagagctcca caggtatatg tcttgcctcc accagaagaa 1140  
 gagatgacta agaaacaggt cactctgacc tgcatggtca cagacttcat gcctgaagac 1200  
 atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa acagagctaa actacaagaa cactgaacca 1260  
 gtcctggact ctgatggttc ttacttcatg tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac 1320  
 tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca gtggtccacg aggtctgca caatcaccac 1380  
 acgactaaga gcttctcccg gactccgggt aaa 1413

<210> 51  
 <211> 471  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 51

5

ES 2 667 568 T3

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

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

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

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn  
65 70 75 80

ES 2 667 568 T3

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

ES 2 667 568 T3

325

330

335

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu  
 340 345 350

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

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

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp  
 385 390 395 400

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys  
 405 410 415

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser  
 420 425 430

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser  
 435 440 445

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser  
 450 455 460

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 465 470

- <210> 52
- <211> 705
- <212> ADN
- <213> Mus musculus
- <400> 52

5



ES 2 667 568 T3

atggatthttc tgggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60  
 agaggacaaa ttgtttctctc ccagtctcca acaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120  
 gtcacaatga cttgcagggc cagctcaaga ctaatttaca tgcattggta tcagcagaag 180  
 ccaggatcct cccccaaacc ctggatthtat gccacatcca acctggcttc tggagtccct 240  
 gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300  
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggaata gtaaccacc cacgttcggt 360  
 actgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420  
 ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 480  
 taccoccaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aatggcgctc 540  
  
 ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc 600  
 acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 660  
 acatcaactt caccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgt 705

<210> 53  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 53

5

ES 2 667 568 T3

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

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile  
 20 25 30

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

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

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 100 105 110

Asn Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 115 120 125

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

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

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 165 170 175

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

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

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 210 215 220

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

<210> 54  
 <211> 28

ES 2 667 568 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de PCR

5 <400> 54  
 ccacgcgccc ttagcggcg cattaagc 28

<210> 55  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 55  
 aaaccggga gcttttgca aaagcctagg 30

15 <210> 56  
 <211> 1704  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> señal de secreción de la cadena kappa humana, región constante de la cadena kappa humana y señal  
 adicional poli-A humana

<400> 56

ggtaccaccc aagctggcta ggtaagcttg ctagcgccac catggtgctg cagacccagg 60

tgttcatctc cctgctgctg tggatctccg ggcgatatgg cgatatcgtg atgattaaac 120

gtacgggtggc cgccccctcc gtgttcatct tccccccctc cgacgagcag ctgaagtccg 180

gcaccgcctc cgtggtgtgc ctgctgaata acttctaccc cagagaggcc aaggtgcagt 240

ggaaggtgga caacgccctg cagtccggga actcccagga gagcgtgacc gagcaggaca 300

gcaaggacag cacctacagc ctgagcagca ccctgaccct gagcaaagcc gactacgaga 360

agcacaaggt gtacgcctgc gaggtgacct accagggcct gagctcccc gtcaccaaga 420

gcttcaacag gggggagtgt taggggcccg tttaaacggg tggcatccct gtgaccctc 480

cccagtgctt ctctggccc tggagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaat 540

ES 2 667 568 T3

aaaattaagt tgcatacattt tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tgggggtggag 600  
 ggggggtggtta tggagcaagg ggcaagttgg gaagacaacc tgtagggcct gcgggggtcta 660  
 ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc actgcaatct cgcctcctg 720  
 ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc cgagttggtg ggattccagg catgcatgac 780  
 caggctcacc taatTTTTgt tTTTTTggtta gagacgggggt ttcaccatat tggccaggct 840  
 ggtctccaac tcctaactctc aggtgatcta cccaccttgg cctcccaaat tgctgggatt 900  
 acagggcgtga accactgctc cacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcggggtgtgg 960  
 tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcgcgccgt cctttcgctt 1020  
 tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcggggggc 1080  
 tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg 1140  
 gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg 1200  
 agtccacggt ctttaataagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct 1260  
 cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg 1320  
 agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc agttaggggtg 1380  
 tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc 1440  
 agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca 1500  
 tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc 1560  
 gccagttcc gccattctc cgcgccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc 1620  
 cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct 1680  
 aggcttttgc aaaaagctcc cggg 1704

<210> 57

<211> 1120

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia señal y región constante de IgG1 humana

<400> 57

ES 2 667 568 T3

tgctagegcc accatgaaac acctgtgggtt cttcctcctg ctgggtggcag ctcccagatg 60  
 ggtgctgagc caggtgcaat tgtgcaggcg gttagctcag cctccaccaa gggcccaagc 120  
 gtcttcccc tggcacccctc ctccaagagc acctctggcg gcacagccgc cctgggctgc 180  
 ctgggtcaagg actacttccc cgaaccctgt accgtgagct ggaactcagg cgccctgacc 240  
 agcggcgtgc acaccttccc cgctgtcctg cagtccctcag gactctactc cctcagcagc 300  
 gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 360  
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 420  
  
 acatgcccac cctgcccagc acctgaactc ctgggggggac cctcagtctt cctcttcccc 480  
 ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg 540  
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 600  
 cataatgcca agacaaagcc ccgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 660  
 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720  
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg ccagccccgg 780  
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840  
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 900  
 ggccagcccg agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960  
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcagggcaa cgtcttctca 1020  
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacc agaagagcct ctccctgtct 1080  
 cccggcaaat gagatatcg gcccgtttaa acgggtggca 1120

<210> 58

<211> 699

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de M30 quimérico

<400> 58

ES 2 667 568 T3

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc 60  
 caaattgttc tctcccagtc tccaacaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 120  
 atgacttgca gggccagctc aagactaatt tacatgcatt ggtatcagca gaagccagga 180  
 tcctccccc aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 240  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagagt ggaggctgaa 300  
 gatgctgcc cttattactg ccagcagtg aatagtaacc caccacggt cggtactggg 360  
 accaagctgg agctgaaacg tacgggtggc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc 420  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtgggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480  
 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540  
 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600  
 agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660  
 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 59

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de M30 quimérico

<400> 59

ES 2 667 568 T3

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

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

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg  
 35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys  
 50 55 60

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

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

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser  
 100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 60  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 667 568 T3

<220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 60  
 aaacatatgg ccaaattgtt ctctcccagt ctccaacaat cc 42

5 <210> 61  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 61  
 aaacgtacgt ttcagctcca gcttggctcc agtaccg 37

15 <210> 62  
 <211> 1413  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena pesada de M30 quimérico

<400> 62

atgaaacacc tgtgggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60

gtccagctgc agcagctctgg acctgagctg gtaaagcctg gggcttcagt gaagatgtcc 120

tgcaaggctt ctggatacac attcactaac tatgttatgc actgggtgaa gcagaagcct 180

gggcagggcc ttgagtggat tggatatatt aatccttaca atgatgatgt taagtacaat 240

gagaagttca aaggcaaggc cacacagact tcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

gaactcagca gcctgacctc tgaggactct ggggtctatt actgtgcaag atgggggtac 360

tacggtagtc ccttatacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtcagc 420

tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctcca gagcacctct 480

ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540

agctggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

20 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780



ES 2 667 568 T3

```

ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctccccggacc      840
cctgagggtca catgcggtgt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccccggga ggagcagtac      960
aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc     1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc     1080
tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag      1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtca aaggcttcta tcccagcgac     1200
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc     1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1320
tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1380
accagaaga gcctctcctt gtctcccggc aaa                                  1413

```

<210> 63

<211> 471

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de M30 quimérico

<400> 63

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1          5          10          15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20          25          30

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

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50          55          60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 65          70          75          80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
 85          90          95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115         120         125

```

ES 2 667 568 T3

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

ES 2 667 568 T3

370

375

380

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

- 5 <210> 64  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> cebador de PCR
- <400> 64  
aaagctgagc gaggctccagc tgcagcagtc tggacctgag 40
- 10 <210> 65  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> cebador de PCR
- <400> 65  
gaggtcaggc tgctgagttc catgtaggct gtgctg 36
- 20 <210> 66  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> cebador de PCR
- <400> 66  
cagcacagcc tacatggaac tcagcagcct gacctc 36
- 25 <210> 67  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> cebador de PCR

ES 2 667 568 T3

<400> 67  
 aaagctgagc tgactgtgag agtgggtgcct tggccccag 39  
  
 <210> 68  
 <211> 40  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 68  
 10 aaagctgagc gaggctccagc tgcagcagtc tggacctgag 40  
  
 <210> 69  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 69  
 aaagctgagc tgactgtgag agtgggtgcct tggccccag 39  
  
 <210> 70  
 20 <211> 699  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cadena ligera humanizada de M30  
  
 25 <400> 70  
  
 atgggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc 60  
 gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120  
 ctgagctgca gagccagcag ccgcctgatc tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180  
 caggccccca gactgctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240  
 ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tctctcggct ggaacccgag 300  
 gacttcgccc tgtactactg ccagcagtg gaaacagcaacc cccccacctt cggccagggc 360  
 accaaggtcg aatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc 420  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtgggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480  
 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtccgggaa ctcccaggag 540  
  
 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600  
 agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660  
 agctccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699  
  
 <210> 71  
 <211> 233  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>

ES 2 667 568 T3

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 71

```

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

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

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

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50          55          60

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

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

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

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115          120          125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130          135          140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145          150          155

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165          170          175

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225          230

```

ES 2 667 568 T3

<210> 72  
 <211> 699  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 72  
 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc 60  
 gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120  
 ctgagctgca gagccagcag caggctgac tacatgcaact ggtatcagca gaagcccggc 180  
 caggccccca gactgtggat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240  
 ttttctggca gcggcagcgg caccgactac accctgacca tcagccgcct ggaacccgag 300  
 gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc 360  
 accaaggtcg aatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc 420  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480  
 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540  
 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600  
 agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660  
 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

10 <210> 73  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena ligera humanizada de M30

15 <400> 73

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

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser



ES 2 667 568 T3

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc 60  
 cagatcgtgc tgtcccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120  
 ctgacctgca gagccagcag caggctgata tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180  
 agcgccccca agctgtggat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240  
 ttttctggca gcggcagcgg caccagctac acctgacca tctcccgctt ggaacccgag 300  
 gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc 360  
 accaaggtcg aatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc 420  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480  
 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540  
 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600  
 agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgacca ccagggcctg 660  
 agtcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 75

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 75



ES 2 667 568 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys  
50 55 60

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

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

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

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
165 170 175

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 76  
<211> 699  
<212> ADN

ES 2 667 568 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 76

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc	60
gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc	120
ctgagctgca gagccagcag ccgcctgatc tacatgcaact ggtatcagca gaagcccggc	180
caggcccca gacctctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga	240
ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tcagcagcct ggaacccgag	300
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc	360
accaaggtcg aatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc	420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc	480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag	540
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg	600
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgacca ccagggcctg	660
5 agctccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt	699

<210> 77

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 77

ES 2 667 568 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60

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

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

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

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 78  
 <211> 699

ES 2 667 568 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena ligera humanizada de M30

5 <400> 78

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc      60
cagatcgtgc tgtcccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc      120
ctgacctgca gagccagcag caggctgata tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc      180
agcgcaccca agccttgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga      240
ttttctggca gcggcagcgg caccagctac acctgacca tctcccgcct ggaacccgag      300
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc ccccccactt cggccagggc      360
accaaggtcg aatcaagcg tacggtggcc gcccctccg tgttcatctt cccccctcc      420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc      480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag      540
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg      600
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgacca ccagggcctg      660
agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt      699
  
```

<210> 79  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 79

```

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

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

ES 2 667 568 T3

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

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys  
 50 55 60

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

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

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

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 80  
 <211> 699  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 80

ES 2 667 568 T3

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc 60  
gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120  
ctgagctgca gagccagcag ccgcctgata tacatgcaact ggtatcagca gaagcccggc 180  
caggccccca gacctctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240  
ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tcagccgcct ggaacccgag 300  
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc 360  
accaaggtcg aatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc 420  
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480  
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540  
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600  
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660  
agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 81  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Cadena ligera humanizada de M30  
<400> 81

ES 2 667 568 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60

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

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

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

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 82  
 <211> 699  
 <212> ADN

ES 2 667 568 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 82

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc	60
gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc	120
ctgagctgca gagccagcag ccgcctgatc tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc	180
caggcccccac gacctctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga	240
ttttctggca gcggcagcgg caccgactac acctgacca tcagccgcct ggaacccgag	300
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc	360
accaaggtcg aatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc	420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc	480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag	540
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg	600
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg	660
5 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt	699

<210> 83

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 83



ES 2 667 568 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60

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

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

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

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 84  
 <211> 1413  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 667 568 T3

<220>

<223> Cadena pesada humanizada de M30

<400> 84

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag      60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc      120
tgcaaggcca ggggctacac cttcaccaac tacgtgatgc actgggtgcg ccaggcccct      180
gggcagggac tggaatggat gggctacatc aaccctaca acgacgacgt gaagtacaac      240
gagaagttca agggcagagt gaccatcacc gccgacgaga gcaccagcac cgcctacatg      300
gaactgagca gcctgctggag cgaggacacc gccgtgtact actgctccag atggggctac      360
tacggcagcc ccctgtacta cttcgtactc tggggccagg gcaccctggt gacagtctgc      420
tcagcctcca ccaagggcc aagcgtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct      480
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccctg      540
agctggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc      600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag      660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacia gagagttgag      720
cccaaattct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg      780
ggaccctcag tcttctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc      840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccccggga ggagcagtac      960
aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc     1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc     1080
tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag     1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac     1200
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc     1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1320
tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1380

accagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa                                     1413

```

5

<210> 85

<211> 471

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena pesada humanizada de M30

<400> 85

ES 2 667 568 T3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn  
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
130 135 140

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

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

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

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

ES 2 667 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

ES 2 667 568 T3

450

455

460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

5

<210> 86  
<211> 1413  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cadena pesada humanizada de M30  
  
<400> 86

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag      60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc     120
tgcaaggcca gcggtctacac cttcaccaac tacgtgatgc actgggtgcg ccaggcccct     180
gggcagggac tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacgacgt gaagtacaac     240
gagaagttca agggcagagt gaccatcacc gccgacgaga gcaccagcac cgcctacatg     300
gaactgagca gcctgctggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag atggggctac     360
tacggcagcc ccctgtacta cttcgtactac tggggccagg gcaccctggg gacagtcagc     420
tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctcca gagcacctct     480
ggcggcacag ccgcctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg     540
agctggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc     600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccacg     660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag     720
cccaaactct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg     780
ggaccctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc     840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac     900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccccggga ggagcagtac     960
aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc    1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc    1080
tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag    1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtc aaggcttcta tcccagcgac    1200
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc    1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg    1320
tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac    1380
accagaaga gcctctcct gtctcccggc aaa                                     1413

```

ES 2 667 568 T3

<210> 87  
 <211> 471  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Cadena pesada humanizada de M30

<400> 87

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn  
 65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe  
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 130 135 140

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

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

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

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

ES 2 667 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 667 568 T3

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

5 <210> 88  
<211> 1413  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cadena pesada humanizada de M30

<400> 88

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag      60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccgg gcagcagcgt gaaggtgtcc      120
tgcaaggcca ggggctacac cttcaccaac tacgtgatgc actgggtgaa acaggcccct      180
gggcagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacgacgt gaagtacaac      240
gagaagttca agggcaaggc caccatcacc gccgacgaga gcaccagcac cgctacatg      300
gaactgagca gcctgctggg cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag atggggctac      360
tacggcagcc ccctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggt gacagtcagc      420
tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct      480
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg      540
agctggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc      600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccacg      660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag      720
cccaaattct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg      780
ggaccctcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc      840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccccggga ggagcagtac      960
aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc     1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc     1080
tccaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag     1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac     1200
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc     1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1320
tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1380
accagaaga gcctctcctt gtctcccggc aaa                                     1413

```

10 <210> 89  
<211> 471  
<212> PRT



ES 2 667 568 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada humanizada de M30

<400> 89

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1           5           10           15

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

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

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50           55           60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 65           70           75

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 85           90           95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115          120          125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130          135          140

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

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

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

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

```

ES 2 667 568 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 667 568 T3

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

5 <210> 90  
<211> 1413  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cadena pesada humanizada de M30

<400> 90

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcagag 60  
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc 120  
tgcaaggcca gcggtctacac cttcaccaac tacgtgatgc actgggtcaa gcaggcccct 180  
gggcagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacgacgt gaagtacaac 240  
gagaagttca agggcaaggc caccagacc agcgacaaga gcaccagcac cgcctacatg 300  
gaactgagca gcctgctggg cgaggacacc gccgtgtact actgctccag atggggctac 360  
tacggcagcc ccctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtcagc 420  
tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 480  
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540  
agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600  
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660  
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacia gagagttgag 720  
cccaaactct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780  
ggaccctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840  
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900  
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacia agccccggga ggagcagtac 960  
aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020  
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080  
tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1140  
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200  
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc 1260  
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320  
tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380  
accagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

10 <210> 91  
<211> 471  
<212> PRT

ES 2 667 568 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada humanizada de M30

<400> 91

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
1 5 10 15

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

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

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn  
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser  
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
130 135 140

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

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

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

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

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

5





## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, **caracterizado por** tener las siguientes propiedades de:
  - (a) unirse específicamente a B7-H3, en el que B7-H3 es una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 o 10, y el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo se une a un polipéptido que consiste en IgC2, en el que IgC2 es un dominio de B7-H3;
  - (b) tener una actividad de fagocitosis mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCP);
  - (c) tener una actividad antitumoral in vivo, y
  - (d) tener una actividad inhibidora competitiva contra el anticuerpo M30 para la unión a B7-H3, en el que el anticuerpo M30 comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos 23 a 235 de la SEQ ID NO: 53.
2. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que se une a IgC1 e IgC2, cada uno de los cuales es un dominio de B7-H3.
3. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que IgC2 es un dominio que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 358 a 456 en la SEQ ID NO: 6.
4. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que IgC1 es un dominio que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 140 a 244 en la SEQ ID NO: 6.
5. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).
6. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tumor es cáncer.
7. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de esófago o cáncer de riñón.
8. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 92, CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 93, y CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 94 como regiones de la cadena pesada determinantes de la complementariedad y comprende CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 95, CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 96, y CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 97 como regiones de la cadena ligera determinantes de la complementariedad.
9. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 51 y una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 23 a 130 en la SEQ ID NO: 53.
10. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que una región constante es una región constante derivada de ser humano.
11. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 63 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 59.
12. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es humanizado.
13. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende: una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 85, (b) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 87, (c) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 89, (d) una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 en la SEQ ID NO: 91, (e) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % o más con cualquiera de las secuencias (a) a (d), y (f) una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se eliminan,





5 números de aminoácidos 20 a 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 83; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 75; y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 21 a 233 en la SEQ ID NO: 77.

15 16. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionadas entre el grupo que consiste en: una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 75; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 77; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 79; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 81; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 83; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 75; y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 77.

17. El fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el fragmento funcional se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fab' y Fv.

40 18. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende una primera y una segunda cadenas pesadas, en el que la primera y la segunda cadenas pesadas se seleccionan, cada una, independientemente entre los siguientes (i) a (iii):

- (i) una cadena pesada de longitud completa;
- (ii) una cadena pesada en la que 1 aminoácido se elimina del extremo carboxilo de la cadena pesada; o
- 45 (iii) una cadena pesada en la que 2 aminoácidos se eliminan del extremo carboxilo de la cadena pesada,

preferentemente en el que la primera y la segunda cadenas pesadas se seleccionan, cada una, del punto (ii).

50 19. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la primera y la segunda cadenas pesadas se seleccionan, cada una, independientemente entre los puntos (ii) o (iii), y en el que el resto de aminoácido ubicado en el extremo carboxilo de la cadena pesada está amidado, preferentemente en el que el resto de aminoácido es un resto de prolina.

55 20. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo es una variante modificada que comprende una modificación seleccionada entre el grupo que consiste en: enlace de una fracción química a un resto de aminoácido, una cadena de carbohidrato enlazada a N o enlazada a O, glucosilación enlazada a N o enlazada a O, procesamiento N- o C-terminal, desamidación, isomerización de un resto de ácido aspártico, oxidación de un resto de metionina, y adición de un resto de metionina al extremo N.

21. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que la modificación de un glicano está regulada para potenciar una actividad citotóxica celular dependiente del anticuerpo.



5 nucleótidos 58 a 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 699 en la SEQ ID NO: 82; una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 58 a 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 699 en la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 58 a 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 699 en la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 58 a 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 699 en la SEQ ID NO: 74; y una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 58 a 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótidos representada por los números de nucleótidos 61 a 699 en la SEQ ID NO: 76.

10 28. El polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, que comprende secuencias de nucleótidos seleccionadas entre el grupo que consiste en: una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 74; una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 76; una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 78; una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 80; una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 82; una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 74; y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 76.

25 29. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28.

30. Una célula hospedadora, que está transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 29.

30 31. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 30, en la que la célula hospedadora es una célula eucariota.

32. Un procedimiento de producción de un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, **caracterizado por** comprender una etapa de cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 30 o 31 y una etapa de recoger un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo deseado a partir de un producto cultivado obtenido en la etapa de cultivo.

35 33. Una composición farmacéutica, **caracterizada por** comprender al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 21.

34. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 33, que es para tratar un tumor.

40 35. Una composición farmacéutica para tratar un tumor, **caracterizada por** comprender al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 21 y al menos un agente terapéutico para el cáncer.

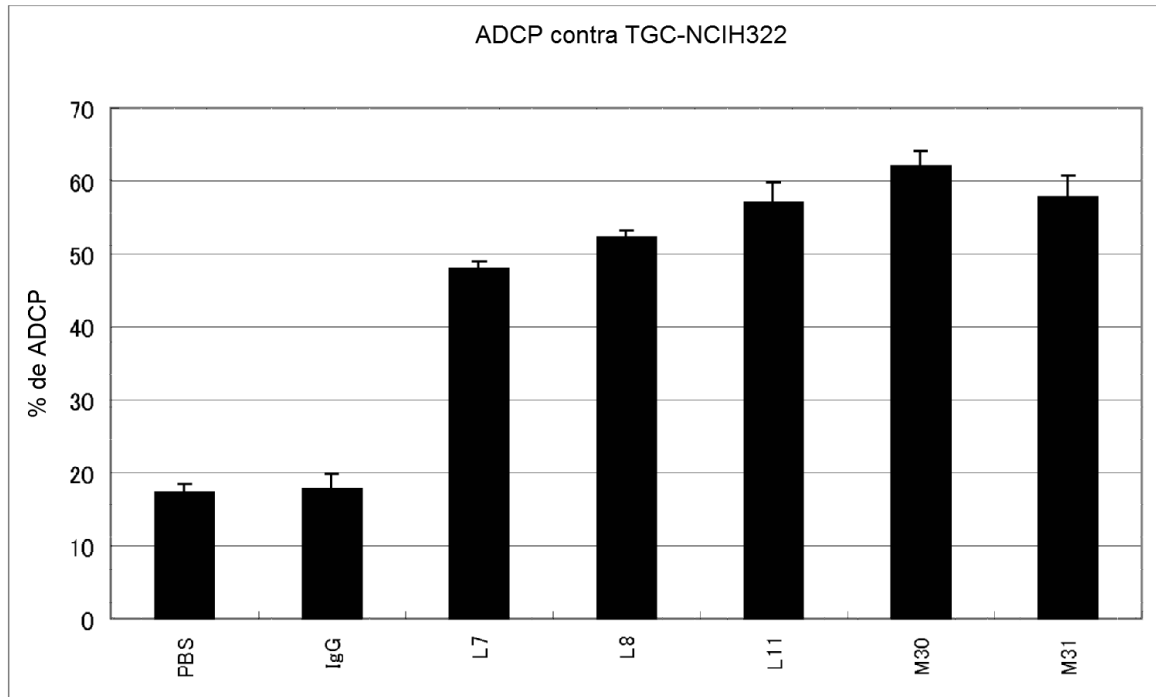
36. El anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 21, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor.

45 37. El anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 21, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor, comprendiendo el procedimiento administrar el anticuerpo o fragmento funcional y al menos un agente terapéutico para el cáncer simultáneamente, por separado o secuencialmente a un individuo.

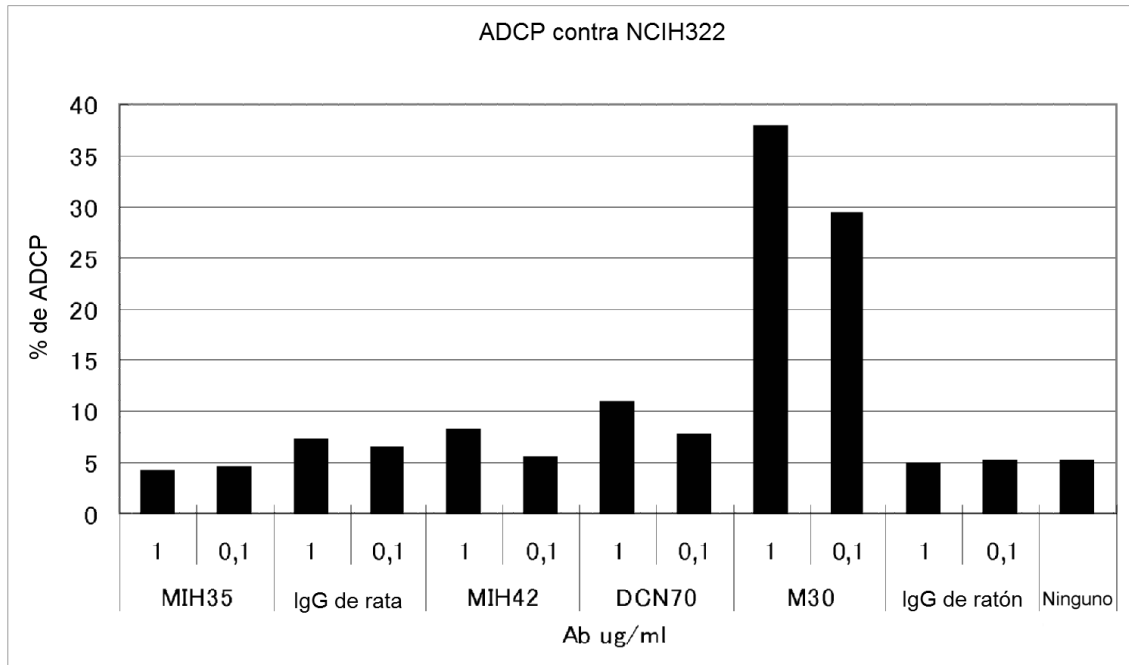
38. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 34 o 35 o el anticuerpo o fragmento funcional para su uso de acuerdo con la reivindicación 36 o 37, en el que el tumor es cáncer.

50 39. La composición farmacéutica, el anticuerpo o fragmento funcional de acuerdo con la reivindicación 38, en el que el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de esófago o cáncer de riñón.

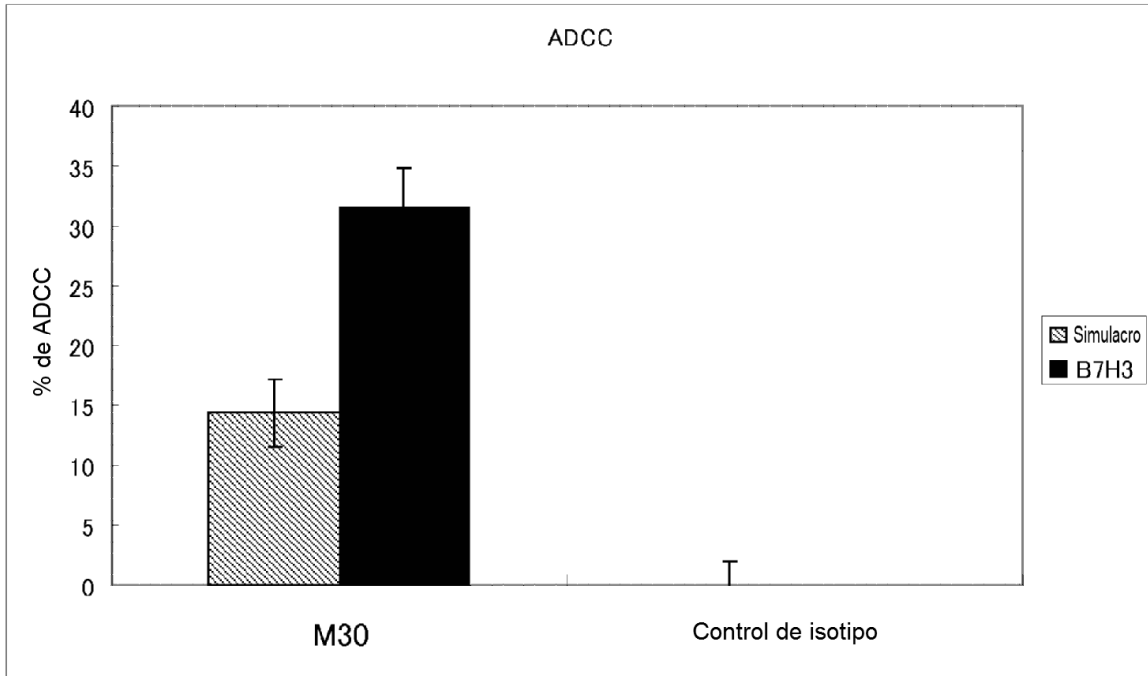
[Fig. 1]



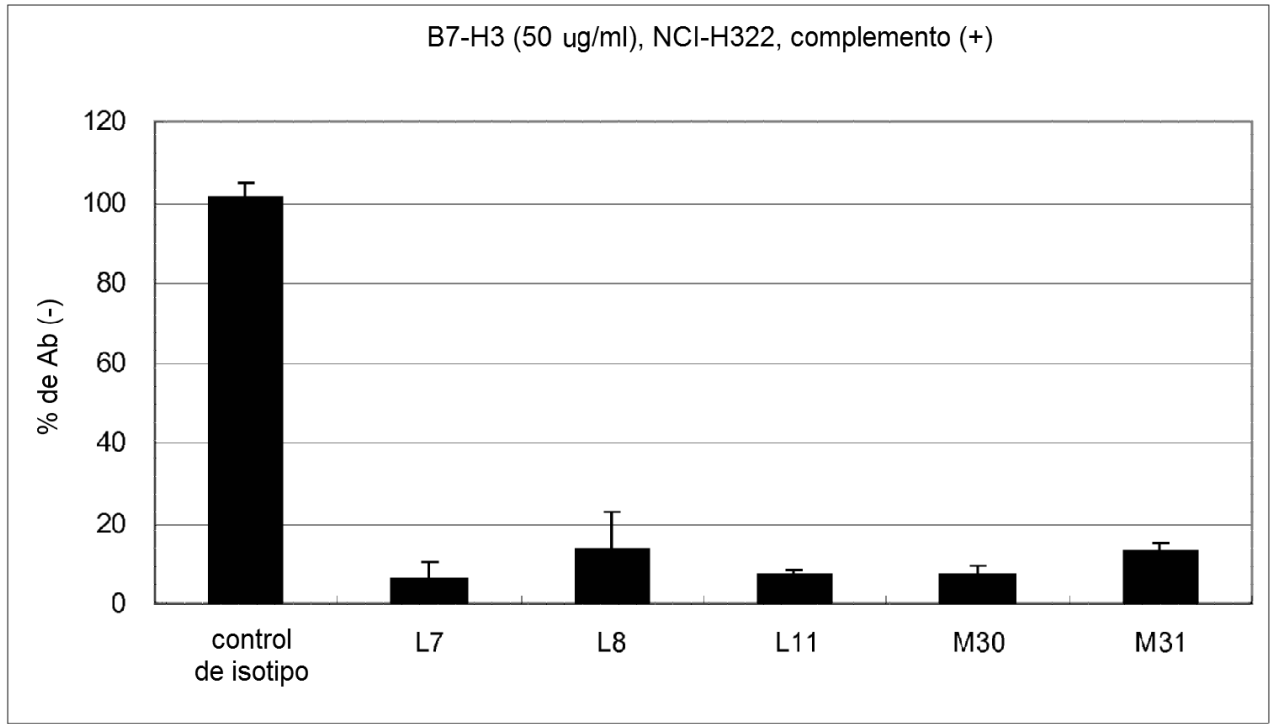
[Fig. 2]



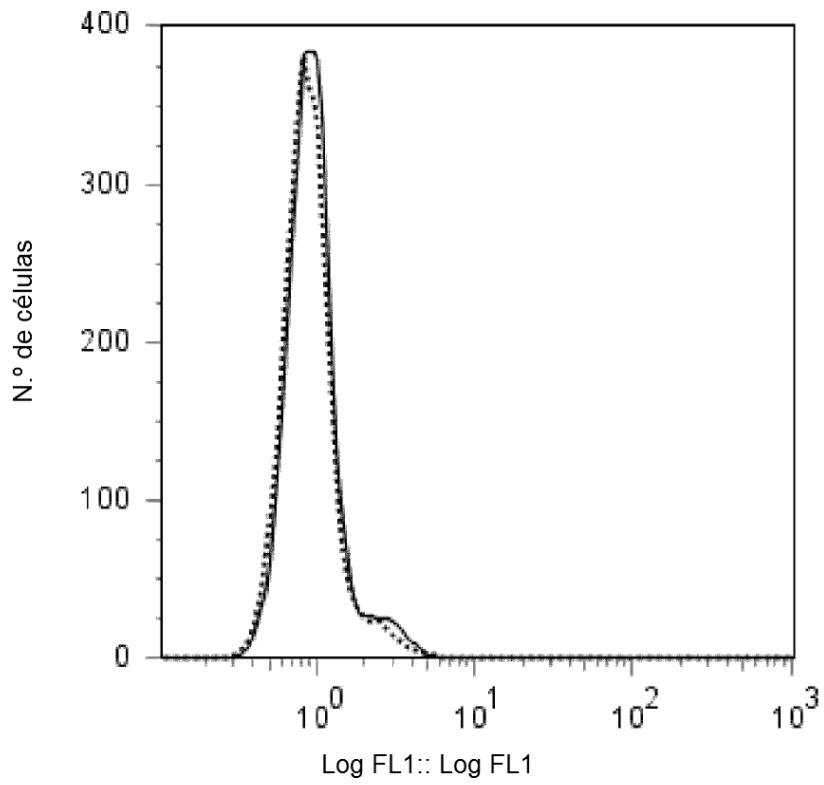
[Fig. 3]



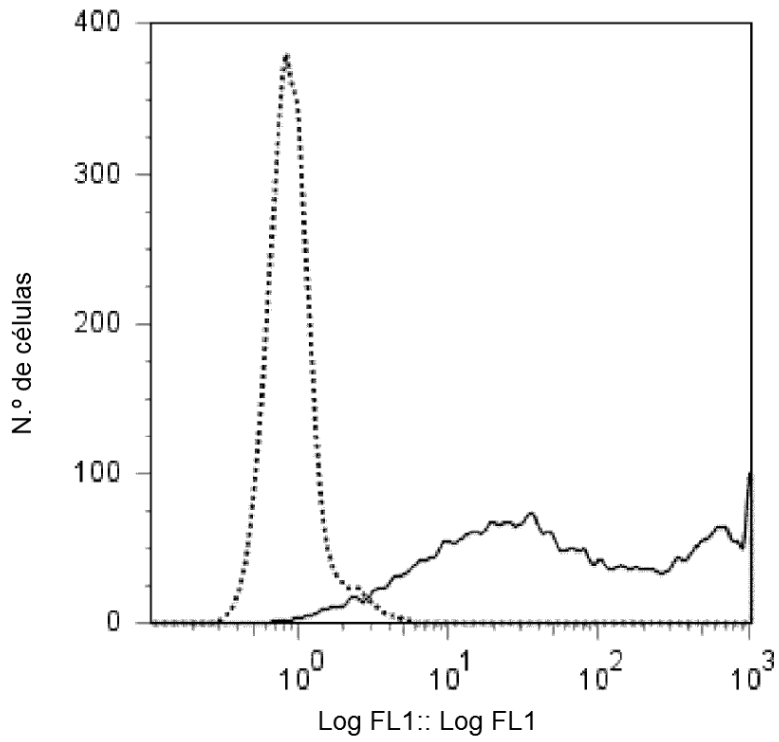
[Fig. 4]



[Fig. 5-1] B7-H3 IgV1

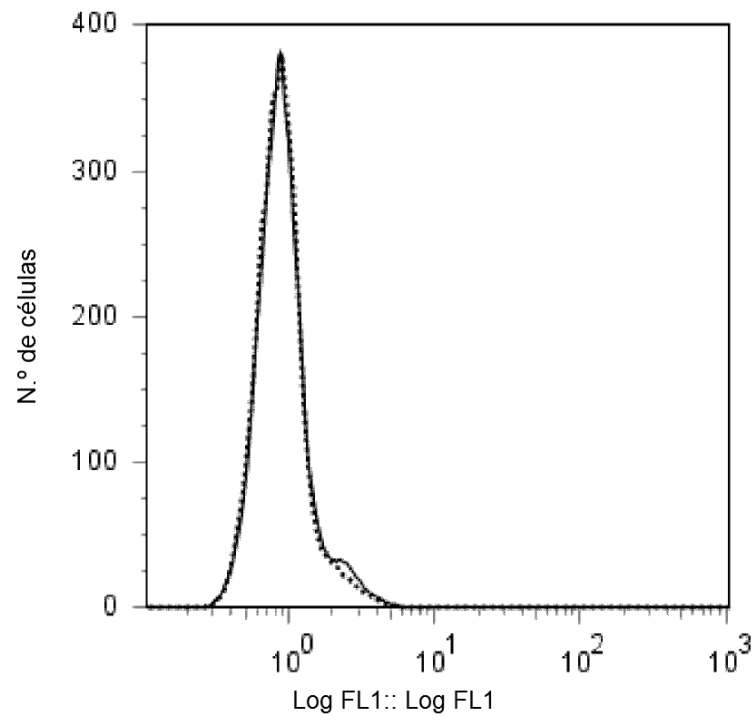


[Fig. 5-2] B7-H3 IgC1

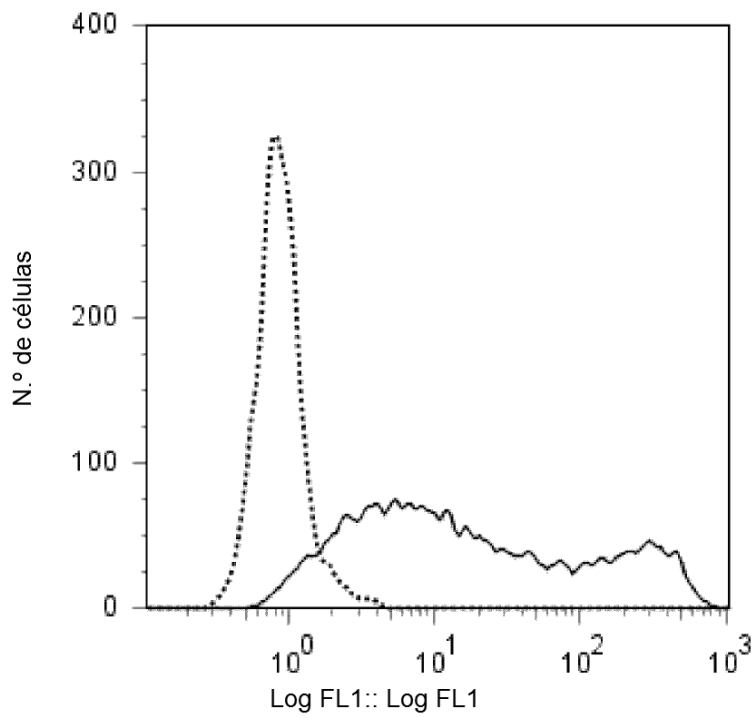




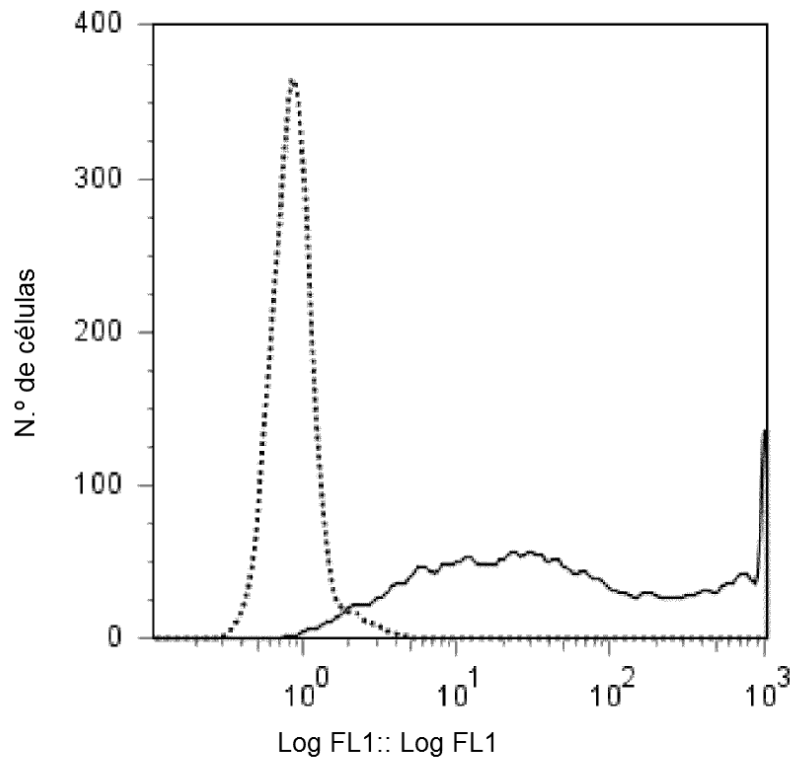
[Fig. 5-3] B7-H3 IgV2



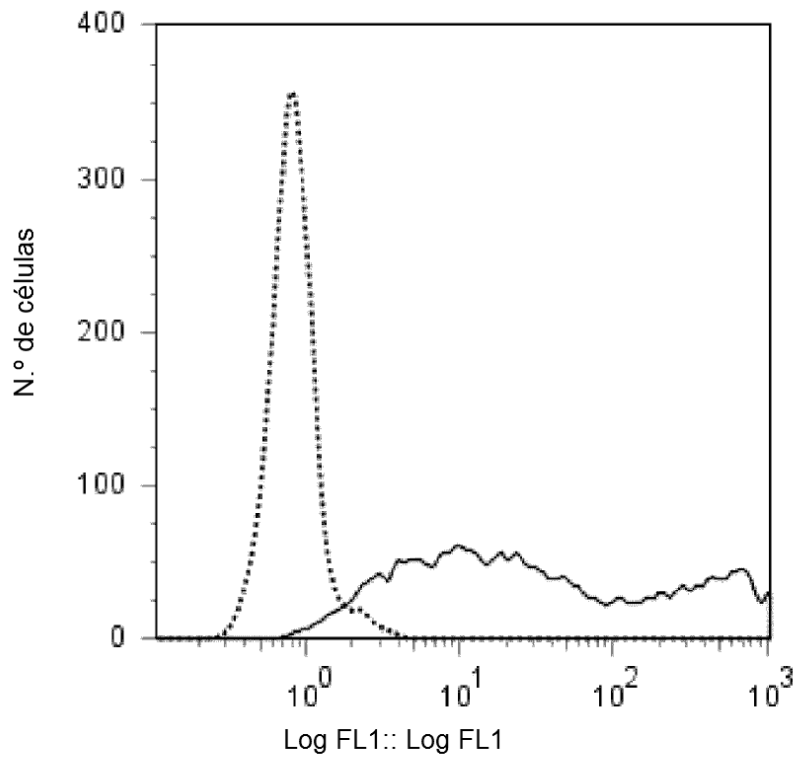
[Fig. 5-4] B7-H3 IgC2



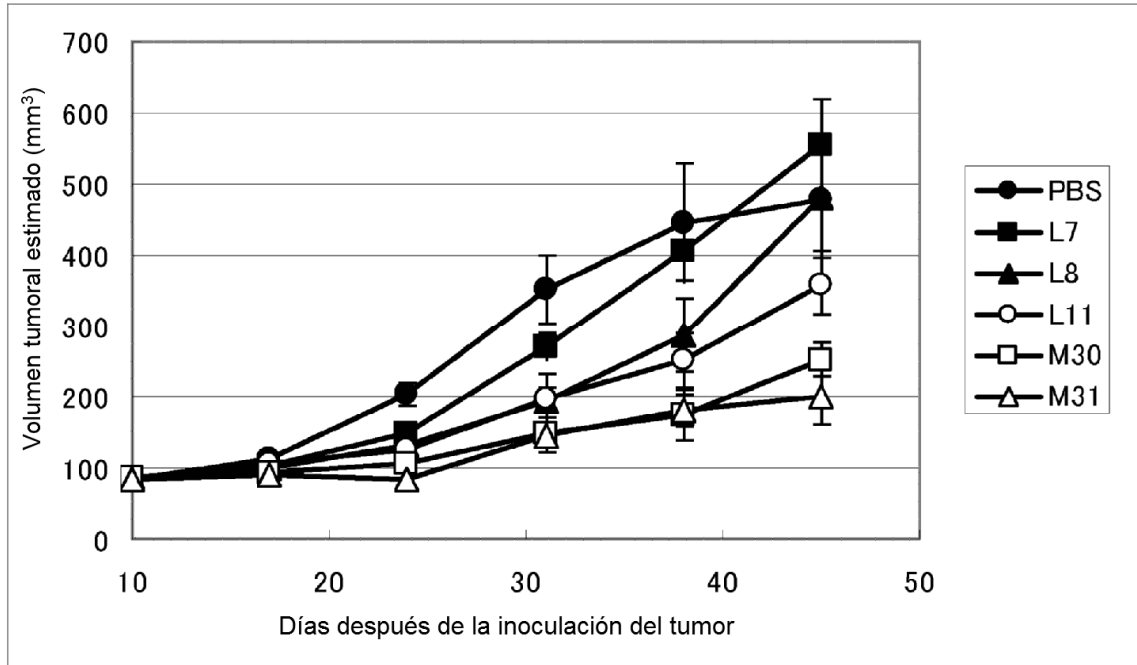
[Fig. 5-5] B7-H3 IgC1-V2-C2



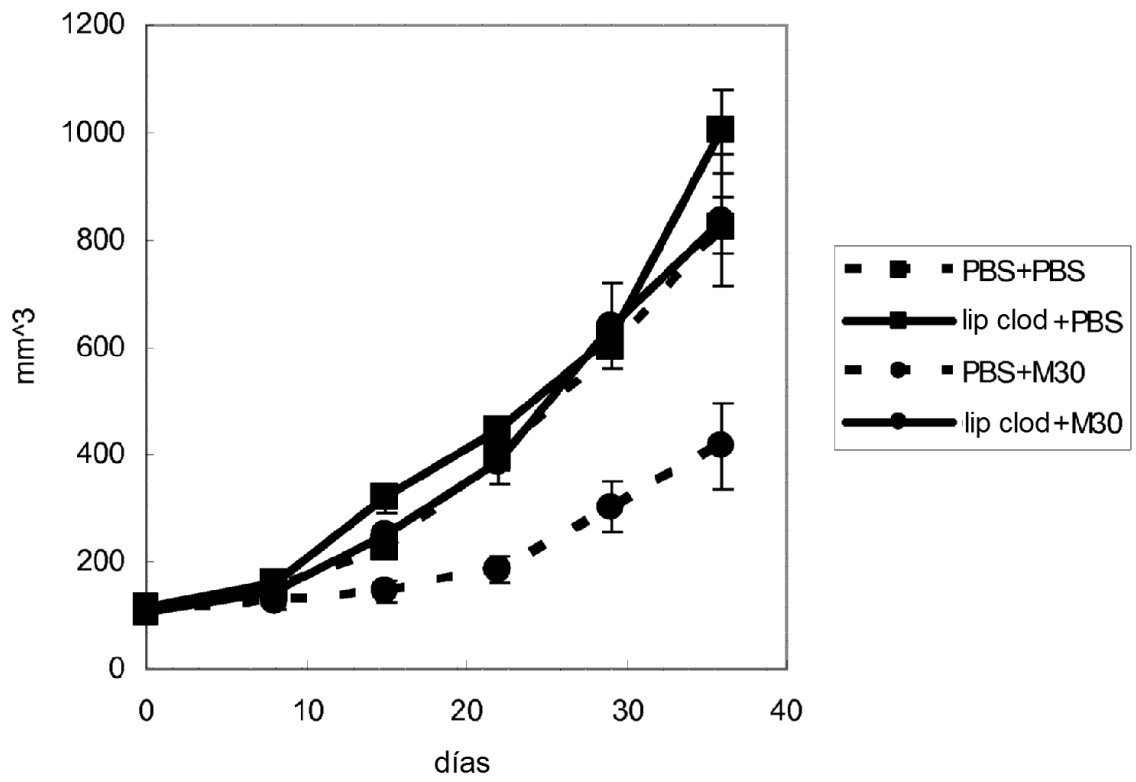
[Fig. 5-6] B7-H3 IgV2-C2



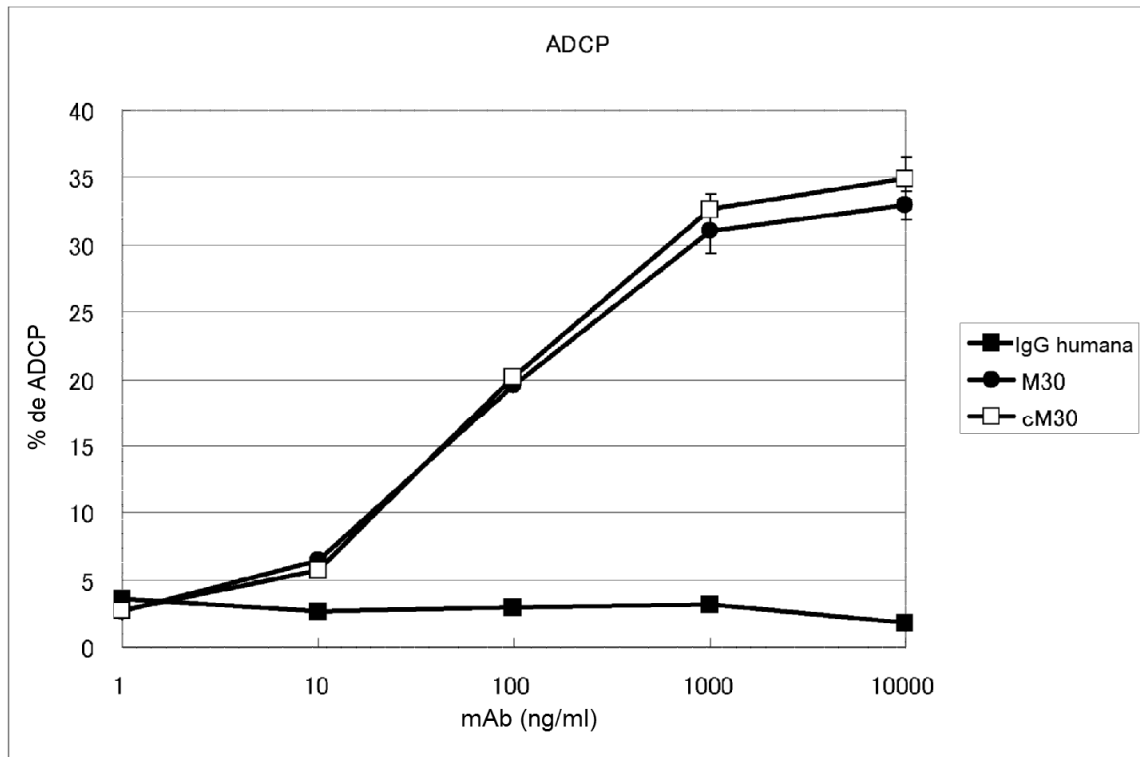
[Fig. 6]



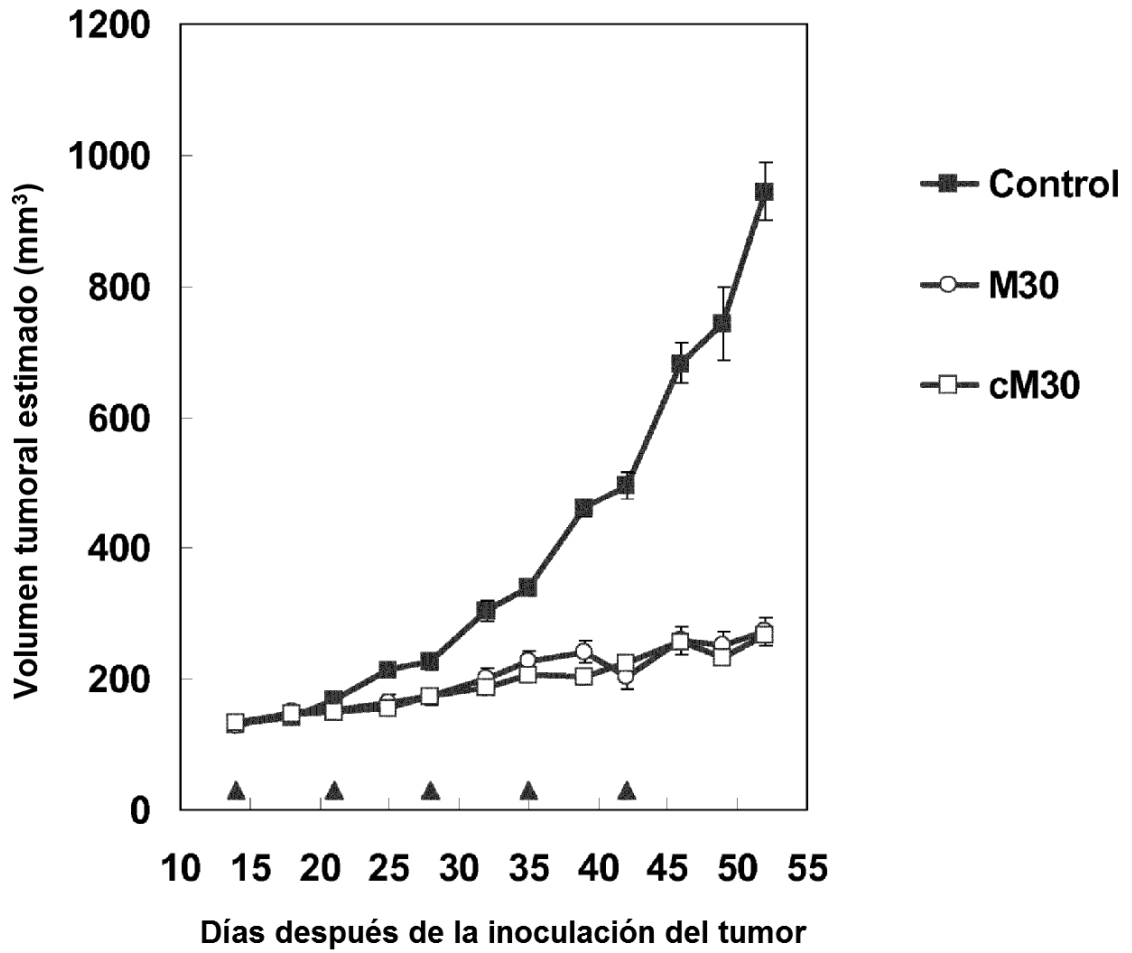
[Fig. 7]



[Fig. 8]

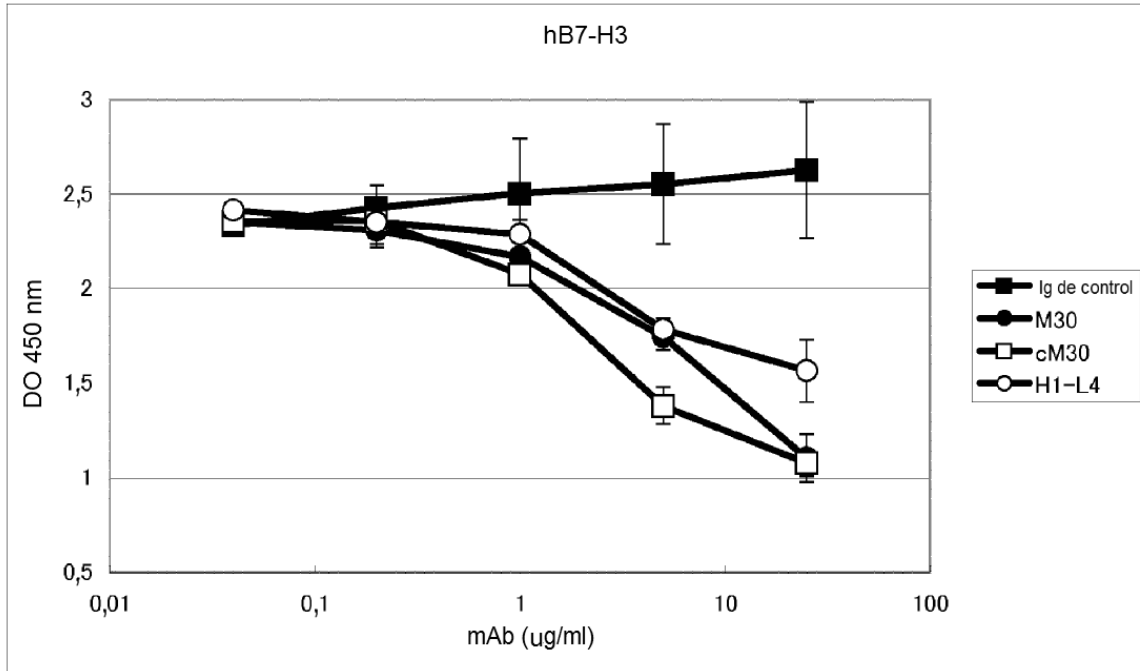


[Fig. 9]



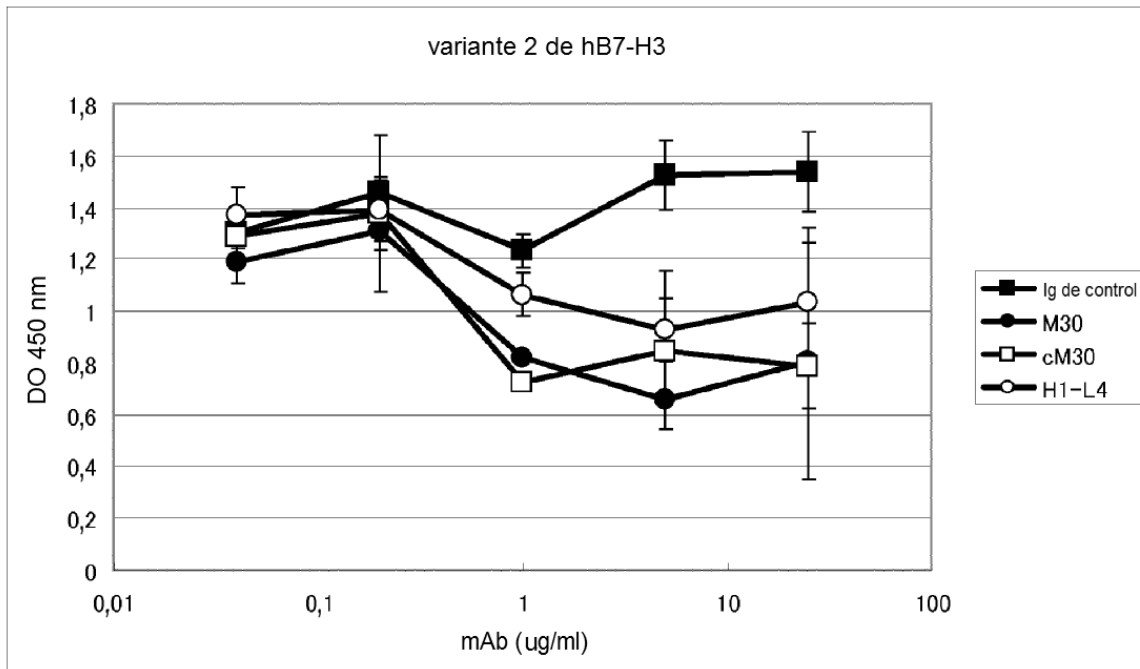
[Fig. 10-1]

variante 1 de B7-H3

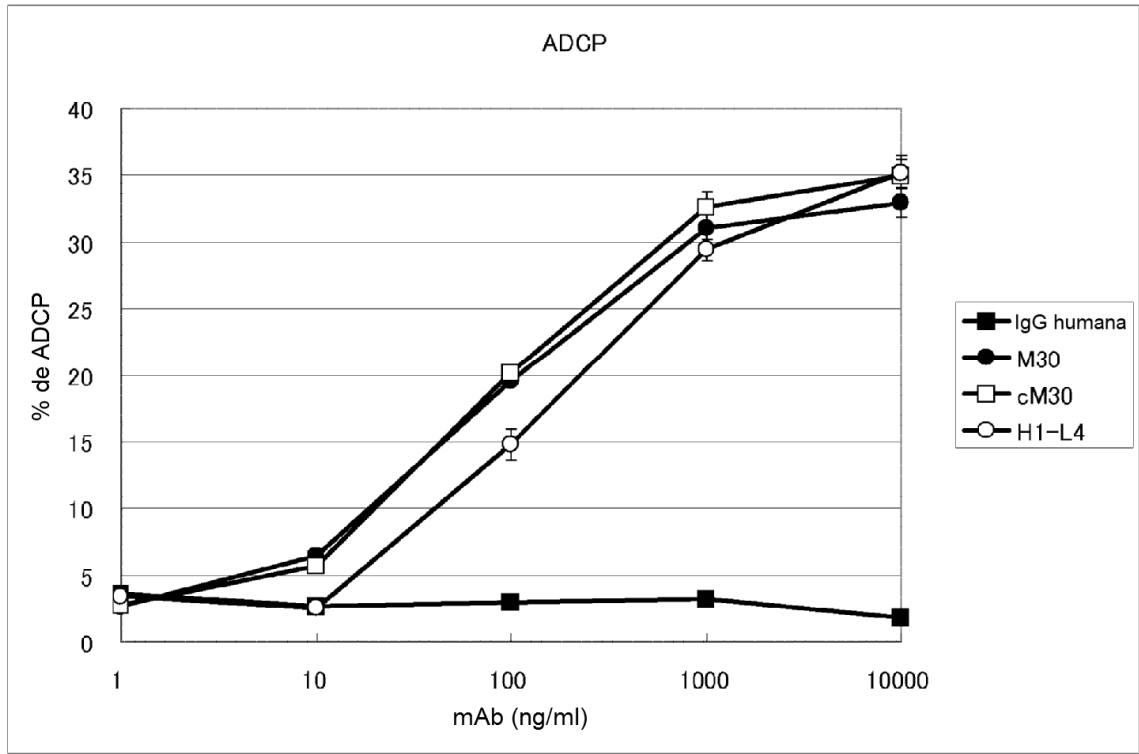


[Fig. 10-2]

variante 2 de B7-H3

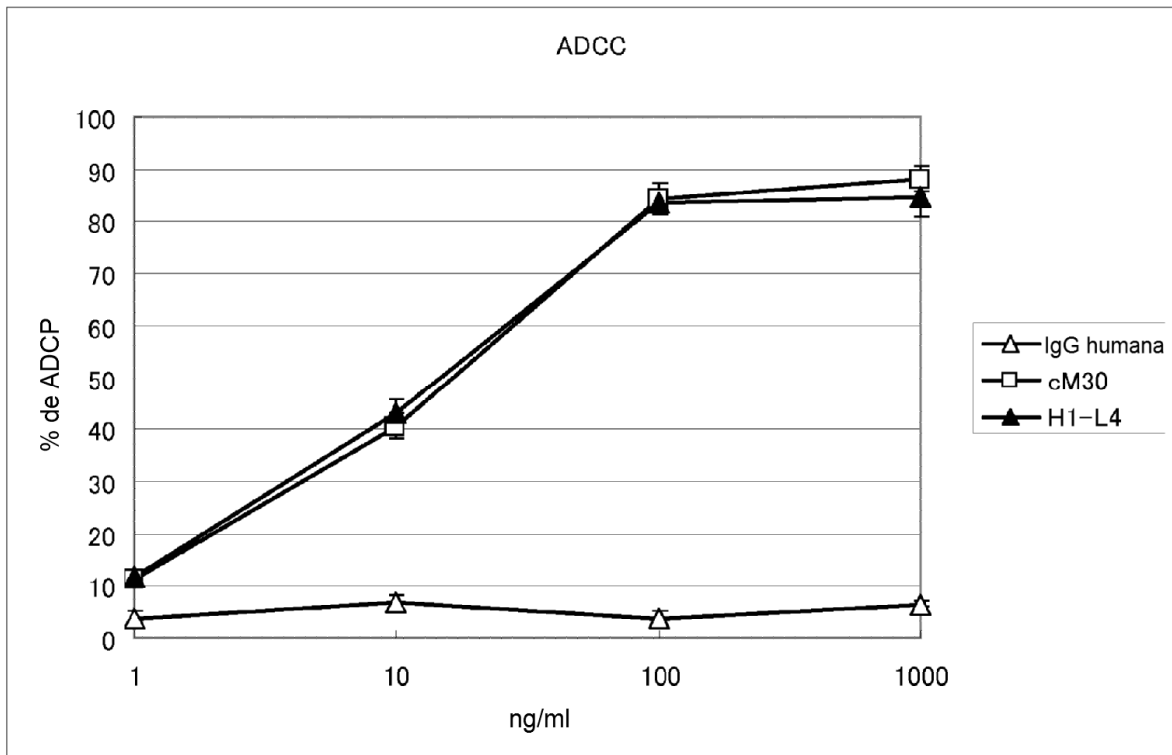


[Fig. 11]





[Fig. 12]



ES 2 667 568 T3

[Fig. 13-1]

Secuencia de nucleótidos de la variante 1 de B7-H3 (SEQ ID NO: 5)

atgctgcgtcggcggggcagccctggcatgggtgtgcatgtgggtgcagccctgggagcactgtgg  
ttctgcctcacaggagccctggaggtccaggtccctgaagaccagtggtggcactggtgggcacc  
gatgccaccctgtgctgctccttctcccctgagcctggcttcagcctggcacagctcaacctc  
atc  
tggcagctgacagataccaacagctgggtgcacagctttgctgagggccaggaccagggcagcgc  
tatgccaaccgcacggccctcttcccggacctgctggcacagggcaacgcatccctgaggctgcag  
cgcgtgcgtgtggcggacgagggcagcttcacctgcttcgtgagcatccgggatttcggcagcgt  
gccgtcagcctgcaggtggccgctccctactcgaagcccagcatgaccctggagcccaacaaggac  
ctgcggccaggggacacggtgacctcacgtgctccagctaccagggctaccctgaggctgaggtg  
ttctggcaggatgggcaggggtgtgccctgactggcaacgtgaccacgtcgcagatggccaacgag  
cagggcttgtttgatgtgcacagcatcctgcgggtgggtgctgggtgcaaattggcacctacagctgc  
ctgggtgcgcaaccccgtgctgcagcaggatgcgcacagctctgtcaccatcacaccccagagaagc  
cccacaggagccgtggaggtccaggtccctgaggaccgggtggcctagtgggcaccgatgcc  
accctgcgctgctccttctccccgagcctggcttcagcctggcacagctcaacctcatctggcag  
ctgacagacaccaaacagctggtgcacagtttcaccgaaggccgggaccagggcagcgcctatgcc  
aaccgcacggccctcttcccggacctgctggcacaaggcaatgcatccctgaggctgcagcgcgtg  
cgtgtggcggacgagggcagcttcacctgcttcgtgagcatccgggatttcggcagcgtgccgtc  
agcctgcaggtggccgctccctactcgaagcccagcatgaccctggagcccaacaaggacctgcgg  
ccaggggacacggtgacctcacgtgctccagctaccggggctaccctgaggctgaggtgttctgg  
caggatgggcaggggtgtgccctgactggcaacgtgaccacgtcgcagatggccaacgagcagggc  
ttgtttgatgtgcacagcgtcctgcgggtgggtgctgggtgcgaatggcacctacagctgcctggtg  
cgcaaccccgtgctgcagcaggatgcgcacggctctgtcaccatcacagggcagcctatgacattc  
ccccagaggccctgtgggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcaactgctggtggccctg  
gctttcgtgtgctggagaaagatcaaacagagctgtgaggaggagaatgcaggagctgaggaccag  
gatggggagggagaaggctccaagacagccctgcagcctctgaaacactctgacagcaaagaagat  
gatggacaagaaatagcctgagcggccgacctgtgctggatctctgcagaattccaccacactgg  
actagtgatccgagctcggtagccttaagtttaaacgctgatcagcctcgactgtgccttc  
tagttgccagccatctgtttgtttgcccctccccgctgccttcttgaccctggaaggtgccactcc  
cactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgc

[Fig. 13-2]

Secuencia de aminoácidos de la variante 1 de B7-H3 (SEQ ID NO: 6)

MLRRRGS PGMGVHVG AALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGT DATLCCSFSPEPGFSLAQLNLI  
WQLTDTKQLVHSFAEQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFV SIRDFGSA

AVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANE  
QGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDA  
TLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRV  
RVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFW  
QDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTF  
PPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKED  
DGQEIA

## ES 2 667 568 T3

[Fig. 14-1]

Secuencia de nucleótidos de la variante 2 de B7-H3 (SEQ ID NO: 9)

```
atgctgctgcgtcggcggggcagccctggcatgggtgtgcatgtgggtgcagccctgggagcactgtgg
ttctgcctcacaggagccctggaggtccaggtccctgaagaccagtggtggcactggtgggcacc
gatgccaccctgtgctgctccttctcccctgagcctggcttcagcctggcacagctcaacctcatc
tggcagctgacagatacacaacagctgggtgcacagctttgctgagggccaggaccaggggcagcgcc
tatgccaaccgcacggccctcttcccggacctgctggcacagggcaacgcatccctgaggctgcag
cgcgtgctgtggcggacgagggcagcttcacctgcttcgtgagcatccgggatttcggcagcgct
gccgtcagcctgcaggtggccgctccctactcgaagcccagcatgaccctggagcccaacaaggac
ctgcggccaggggacacgggtgaccatcacgtgctccagctaccggggctaccctgaggctgagggtg
ttctggcaggatgggcagggtgtgcccctgactggcaacgtgaccacgtcgcagatggccaacgag
cagggcttgtttgatgtgcacagcgtcctgcggggtggtgctgggtgcgaatggcacctacagctgc
ctgggtgcgcaaccccgtgctgcagcaggatgctgcacggctctgtcaccatcacagggcagcctatg
acattccccccagaggccctgtgggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcactgctgggtg
gccctggctttcgtgtgctggagaaagatcaaacagagctgtgaggaggagaatgcaggagctgag
gaccaggatggggaggggagaaggctccaagacagccctgcagcctctgaaacactctgacagcaaa
gaagatgatggacaagaaatagcc
```

[Fig. 14-2]

Secuencia de aminoácidos de la variante 2 de B7-H3 (SEQ ID NO: 10)

```
MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLI
WQLTDTKQLVHSFAEGDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRADEGSFTCFVSIRDFGSA
AVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANE
QGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLV
ALAFVCWRKIKQSCEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHS DSKEDDGQEIA
```

## ES 2 667 568 T3

[Fig. 15-1]

Secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgV1 (SEQ ID NO: 20)

GGAGCCCTGGAGGTCCAGGTCCCTGAAGACCCAGTGGTGGCACTGGTGGGCACCGATGCCACCCTG  
TGCTGCTCCTTCTCCCCTGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACA  
GATACCAAACAGCTGGTGCACAGCTTTGCTGAGGGCCAGGACCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGC  
ACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAGGGCAACGCATCCCTGAGGCTGCAGCGGTGCGTGTG  
GCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTTCCGCAGCGCTGCCGTCAGCCTG  
CAGGTGGCCGGGCAGCCTATGACATTTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTC  
TGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAG  
GAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCT  
CTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 15-2]

Secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV1 (SEQ ID NO: 21)

GALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANR  
TALFPDLLAQGNASLRLQVRVVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAGQPMTFPPEALWVTVGLSV  
CLIALLVALAFVCWRKIKQSCEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSKEDDGQEIA

ES 2 667 568 T3

[Fig. 16-1]

Secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 22)

GCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTG  
ACCATCACGTGCTCCAGCTACCAGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGT  
GTGCCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCAC  
AGCATCCTGCGGGTGGTGCTGGGTGCAAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTG  
CAGCAGGATGCGCACAGCTCTGTCACCATCACACCCAGAGAAGCCCCACAGGGCAGCCTATGACA  
TTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCC  
CTGGCTTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGAC  
CAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAA  
GATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 16-2]

Secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 23)

APYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVH  
SILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVA  
LAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

ES 2 667 568 T3

[Fig. 17-1]

Secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 24)

GGAGCCGTGGAGGTCCAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCGATGCCACCCTG  
CGCTGCTCCTTCTCCCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACA  
GACACCAAACAGCTGGTGCACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGC  
ACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAATGCATCCCTGAGGCTGCAGCGGTGCGTGTG  
GCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTTCCGCAGCGCTGCCGTCAGCCTG  
CAGGTGGCCGGGCAGCCTATGACATTTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTC  
TGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAG  
GAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCT  
CTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 17-2]

Secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 25)

GAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCFSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANR  
TALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAGQPMTFPPEALWVTVGLSV  
CLIALLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHS DSKEDDGQEIA

ES 2 667 568 T3

[Fig. 18-1]

Secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 26)

GCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTG  
ACCATCACGTGCTCCAGCTACCGGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGT  
GTGCCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCAC  
AGCGTCCTGCGGGTGGTGCTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTG  
CAGCAGGATGCGCACGGCTCTGTCACCATCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTG  
TGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTTCGTGTGCTGG  
AGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAA  
GGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATA  
GCCTGA

[Fig. 18-2]

Secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 27)

APYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVH  
SVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCW  
RKIKQSC EEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSKEDDGQEIA



## ES 2 667 568 T3

[Fig. 19-1]

Secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 28)

GCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTG  
ACCATCACGTGCTCCAGCTACCAGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGT  
GTGCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCAC  
AGCATCCTGCGGGTGGTGTGGGTGCAAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTG  
CAGCAGGATGCGCACAGCTCTGTCACCATCACACCCCAGAGAAGCCCCACAGGAGCCGTGGAGGTC  
CAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCGATGCCACCCTGCGCTGCTCCTTCTCC  
CCCAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACAGACACCAAACAGCTG  
GTGCACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGCACGGCCCTCTTCCCG  
GACCTGCTGGCACAAGGCAATGCATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCCTGTGGCGGACGAGGGCAGC  
TTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTTTCGGCAGCGCTGCCGTCAGCCTGCAGGTGGCCGCTCCC  
TACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTGACCATC  
ACGTGCTCCAGCTACCGGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGTGTGCCC  
CTGACTGGCAACGTGACCACGTCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCACAGCGTC  
CTGCGGGTGGTGTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTGCAGCAG  
GATGCGCACGGCTCTGTCACCATCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTG  
ACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTCGTGTGCTGGAGAAAG  
ATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGAGAAGGCTCC  
AAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 19-2]

Secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 29)

APYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVH  
SILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDLRCSFS  
PEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGS  
FTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGV  
LTGNVTTSQMANEQGLFDVHSLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWV  
TVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSKEDDGQEI A

## ES 2 667 568 T3

[Fig. 20-1]

Secuencia de nucleótidos de B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 30)

GGAGCCGTGGAGGTCCAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCGATGCCACCCTG  
CGCTGCTCCTTCTCCCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACA  
GACACCAAACAGCTGGTGCACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGC  
ACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAATGCATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCCTGTG  
GCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTTCCGGCAGCGCTGCCGTCAGCCTG  
CAGGTGGCCGCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGG  
GACACGGTGACCATCACGTGCTCCAGCTACCGGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGAT  
GGGCAGGGTGTGCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTT  
GATGTGCACAGCGTCCTGCGGGTGGTGTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAAC  
CCCCTGCTGCAGCAGGATGCGCACGGCTCTGTACCATCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCA  
GAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTC  
GTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGG  
GAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGA  
CAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 20-2]

Secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 31)

GAVEVQVPEDPVVALVGTDLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANR  
TALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPG  
DTVITITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRN  
PVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDG  
EGEGSKTALQPLKHSKEDDGQEIA

[Fig. 21-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 50)

```
atggaatggagttggatatttctctttctcctgtcaggaactgcaggtgtccactctgaggtccag
ctgcagcagctctggacctgagctggtaaagcctggggcttcagtgaagatgtcctgcaaggcttct
ggatacacattcactaactatggtatgcactgggtgaagcagaagcctgggcagggccttgagtgg
attggatatattaatccttacaatgatgatggttaagtacaatgagaagttcaaaggcaaggccaca
cagacttcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctcagcagcctgacctctgaggactct
gCGgtctattactgtgcaagatgggggtactacggtagtcccttatactactttgactactggggc
caaggcaccactctcacagtctcctcagccaaaacaacagccccatcgggtctatccactggccct
gtgtgtggagatacaactggctcctcgggtgactctaggatgctgggtcaagggttatttcctgag
ccagtgaccttgacctggaactctggatccctgtccagtgggtgtgcacacctcccagctgtcctg
cagtctgacctctacacctcagcagctcagtgactgtaacctcagcacctggcccagccagctcc
atcacctgcaatgtggcccaccggcaagcagcaccaagggtggacaagaaaattgagcccagaggg
cccacaatcaagccctgtcctccatgcaaatgccagcacctaacctcttgggtggaccatccgtc
ttcatcttccctccaaagatcaaggatgtaactcatgatctcctgagccccatagtcacatgtgtg
gtgggtggatgtgagcgaggatgaccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagta
cacacagctcagacacaaacccatagagaggattacaacagtactctccgggtgggtcagtgccctc
cccatccagcaccaggactggatgagtggcaaggagttcaaatgcaagggtcaacaacaaagacctc
ccagcgcccatcgagagaacctctcaaaacccaaagggtcagtaagagctccacaggtatatgtc
ttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatgggtcacagacttc
atgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaagaacact
gaaccagtctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaagaaagaac
tggttggaagaaatagctactcctgttcagtgggtccacgaggggtctgcacaatcaccacagact
aagagcttctcccggactccgggtaaa
```

[Fig. 21-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 51)

```
MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHWVKQKPGQGLEW
IGYINPYNDVVKYNEKFKGKATQTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYYSPLYFDYWG
QGTTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVL
QSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSV
FIFPPKIKDVLMIISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL
PIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF
MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT
KSFSRTPGK
```

## ES 2 667 568 T3

[Fig. 22-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo M30  
(SEQ ID NO: 52)

```
atggattttctggtgcagattttcagcttctgctaatacagtgcttcagtcataatgtccagagga  
caaattggttctctcccagctctccaacaatcctgtctgcatctccaggggagaagggtcacaatgact  
tgcagggccagctcaagactaatttacatgcattggtatcagcagaagccaggatcctccccaaa  
ccctggatttatgccacatccaacctggcttctggagtcctgctcgcttcagtgggcagtgggtct  
gggacctcttactctctcacaatcagcagagtgagggtgaagatgctgccacttattactgccag  
cagtggaatagtaaccacccacgcttcggactgggaccaagctggagctgaaacgggctgatgct  
gcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtg  
tgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaacga  
caaatggcgctcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagc  
accctcagttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaag  
acatcaacttcaccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtg
```

[Fig. 22-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo M30  
(SEQ ID NO: 53)

```
MDFLVQIFSFL LISASVIMSRGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSRLIYMHWYQQKPGSSPK  
PWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGTKLELKRADA  
APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTMSS  
TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
```

[Fig. 23]

Secuencia de ADN que codifica la señal secretora de la cadena k humana, la región constante de cadena k humana y la señal adicional poli-A humana (SEQ ID NO: 56)

ggtaccacccaagctggctaggttaagcttgctagcgccaccatgggtgctgcagaccaggtgttca  
 tctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgatatcgtgatgattaaacgtacggtggccg  
 cccccctcgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtgggtg  
 gcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagt  
 ccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagca  
 ccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccaccagg  
 gcctgagctccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtggttaggggcccgtttaaacgggtg  
 gcatccctgtgacccctccccagtgccctctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccag  
 ccttgctctaataaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggg  
 gtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtcta  
 ttgggaaccaagctggagtgagtgccacaatcttggctcactgcaatctccgcctcctgggttca  
 agcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggctcaccta  
 atttttgtttttttggtagagacggggtttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaatac  
 tcaggtgatctaccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctccacg  
 cgccctgtagcggcgcatthaagcgcggcgggtgtgggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttg  
 ccagcgccttagcgcccgtccttctcctttctcctttcctttctcctcctcctcctcctcctcctc  
 cccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgacc  
 ccaaaaaacttgattaggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgatagacgggtttttcgcc  
 ctttgacgttggagtcacggttctttaaataagtgactccttggtccaaactggaacaactcaacc  
 ctatctcggctctattcttttgatttataagggattttgccgatttccggcctattgggttaaaaaatg  
 agctgatttaacaaaaatthaacgcgaattaattctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaa  
 gtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtg  
 tggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaac  
 catagtcgcccccctaactccgcccatccccgccctaactccgccagttccgccattctccgcc  
 ccatggctgactaattttttttatattatgcagagggccgagggccctctgctctgagctattcca  
 gaagtagtgaggaggctttttttggaggcctaggcttttgcaaaaagctccccggg

## ES 2 667 568 T3

[Fig. 24]

Fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN que codifica aminoácidos de la secuencia señal y la región constante de IgG1 humana (SEQ ID NO: 57)

```
tgctagcgccaccatgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgct
gagccaggtgcaattgtgcaggcggttagctcagcctccaccaagggccaagcgtcttccccctg
gcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactactc
ccgaaccctgacacgtgagctggaactcaggcggcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgct
gtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaacaccaaggtggacaagagagttgag
cccaaactcttgtagacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggacc
tcagtcttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcaca
tgcggtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg
gaggtgcataatgccaagacaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa
gcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtg
tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaa
ggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaag
accaccctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag
agcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactac
accagaagagcctctcctgtctcccggcaaatgagatatcgggcccgtttaaacgggtggca
```

## ES 2 667 568 T3

[Fig. 25-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo quimera del anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 58)

```
atgggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggccaaatt
gttctctcccagctctccaacaatcctgtctgcatctccaggggagaaggtcacaatgacttgcagg
gccagctcaagactaatttacatgcattggtatcagcagaagccaggatcctcccccaaaccctgg
atztatgccacatccaacctggcttctggagtcctgctcgcttcagtggcagtgggtctgggacc
tcttactctctcacaatcagcagagtgagggtgaagatgctgccacttattactgccagcagtgg
aatagtaaccacccacggttcggtactgggaccaagctggagctgaaacgtacggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgcctccgtgggtgtgctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagcaggtgaccaccaggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg
```

[Fig. 25-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo quimera del anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 59)

```
MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSRLIYMHWYQQKPGSSPKPW
IYATSNLASGVPARFSGSGSGLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGTKLELKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[Fig. 26-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo quimera del anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 62)

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgagggtccag  
ctgcagcagctctggacctgagctggtaaagcctggggcttcagtgaagatgtcctgcaaggcttct  
ggatacacattcactaactatgttatgcaactgggtgaagcagaagcctgggcaggccttgagtgg  
attggatatattaatccttacaatgatgatgtaagtacaatgagaagttcaaaggcaaggccaca  
cagacttcagacaaatcctccagcacagcctacatggaactcagcagcctgacctctgaggactct  
gcggtctattactgtgcaagatgggggtactacggtagtcccttatactactttgactactggggc  
caaggcaccactctcacagctcagctcagcctccaccaagggccaagcgtcttccccctggcacc  
tctccaagagcacctctggcggcacagccgacctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaa  
cccgtgaccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctg  
cagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccag  
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaa  
tcttgtgacaaaactcacacatgcccacctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc  
ttcctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccttgaggtcacatgcgtg  
gtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtg  
cataatgccaaagacaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctc  
accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctc  
ccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc  
ctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc  
tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacc  
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg  
tggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag  
aagagcctctcctgtctccccggcaaa

[Fig. 26-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo quimera del anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 63)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFNTNYVMHWVKQKPGQGLEW  
IGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYGSPLYYFDYWG  
QGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV  
FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF



ES 2 667 568 T3

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV'FSCSVMHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[Fig. 27-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L1 (SEQ ID NO: 70)

```
atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgagatc
gtgctgaccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga
gccagcagccgctgatctacatgcactggatcagcagaagcccggccaggccccagactgctg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatcttctggcagcggcagcggcacc
gacttcaccctgaccatctctcggctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaatcaagcgtacggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagcaggtgaccaccagggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg
```

[Fig. 27-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L1 (SEQ ID NO: 71)

```
MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRLL
IYATSNLASGIPARFSGSGSFTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[Fig. 28-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L2 (SEQ ID NO: 72)

atggtgctgcagacccaggtgttcatctcctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgagatc  
gtgctgaccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga  
gccagcagcaggctgatctacatgcaactggtatcagcagaagcccgccaggccccagactgtgg  
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatcttctggcagcggcagcggcacc  
gactacaccctgaccatcagccgctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg  
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaatcaagcgtacgggtggccgcccc  
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgcctccgtgggtgtgcctg  
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtcggg  
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg  
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagcaggtgacccaccagggcctg  
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtgt

[Fig. 28-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L2 (SEQ ID NO: 73)

MVLQTQVFISLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRLW  
IYATSNLASGIPARFSGSGSDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP  
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTL  
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Fig. 29-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L3 (SEQ ID NO: 74)

```
atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggccagatc
gtgctgtcccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgacctgcaga
gccagcagcaggctgatctacatgcactggtatcagcagaagccccggcagcgcacccaagctgtgg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatcttctggcagcggcagcggcacc
agctacaccctgaccatctcccgctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaaatcaagcgtacggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgctg
ctgaataacttctaccccagagagggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagcaggtgaccaccagggcctg
agctcccccgctcaccaagagcttcaacaggggggagtgt
```

[Fig. 29-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L3 (SEQ ID NO: 75)

```
MVLQTQVFISLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRASSRLIYMHWYQQKPGSAPKLW
IYATSNLASGIPARFSGSGSSTSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTL
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[Fig. 30-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L4 (SEQ ID NO: 76)

```
atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgagatc
gtgctgaccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga
gccagcagccgcctgatctacatgcactggtatcagcagaagcccggccaggccccagacctctg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatcttctggcagcggcagcggcacc
gacttcaccctgaccatcagcagcctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggctcgaaatcaagcgtacgggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagcaggtgacccaccagggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg
```

[Fig. 30-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L4 (SEQ ID NO: 77)

```
MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRPL
IYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[Fig. 31-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L5 (SEQ ID NO: 78)

```
atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggccagatc
gtgctgtcccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgacctgcaga
gccagcagcaggctgatctacatgcactggatcagcagaagcccggcagcgcaccaagccttgg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagattttctggcagcggcagcggcacc
agctacaccctgaccatctcccgctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaaatcaagcgtacggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagcaggtgaccaccagggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg
```

[Fig. 31-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L5 (SEQ ID NO: 79)

```
MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRASSRLIYMHWYQQKPGSAPKPW
IYATSNLASGIPARFSGSGSGTSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[Fig. 32-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L6 (SEQ ID NO: 80)

```
atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgagatc
gtgctgaccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga
gccagcagccgcctgatctacatgcactggtatcagcagaagcccggccaggccccagacctctg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatcttctggcagcggcagcggcacc
gacttcaccctgaccatcagccgcctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtggtg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggctcgaatcaagcgtacgggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtcggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagcaggtgacccaccagggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtggt
```

[Fig. 32-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L6 (SEQ ID NO: 81)

```
MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRPL
IYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[Fig. 33-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo M30-L7 (SEQ ID NO: 82)

```
atggtgctgcagacccaggtgttcatctcctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgagatc
gtgctgaccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga
gccagcagccgcctgatctacatgcactggtatcagcagaagcccgccaggccccagacctctg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatcttctggcagcggcagcggcacc
gactacaccctgaccatcagccgcctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaatcaagcgtacgggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaaggtggacaacgccctgcagtcggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagcaggtgacccaccagggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg
```

[Fig. 33-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L7 (SEQ ID NO: 83)

```
MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRPL
IYATSNLASGIPARFSGSGSDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```



## ES 2 667 568 T3

[Fig. 34-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo M30-H1  
(SEQ ID NO: 84)

```
atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcag
ctggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagc
ggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtgcgccaggccctgggcagggactggaatgg
atgggctacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgagaagttcaagggcagagtgacc
atcaccgccgacgagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcgagcagaggacacc
gccgtgtactactgcgccagatggggctactacggcagccccctgtactacttcgactactggggc
cagggcaccctggtgacagtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcacc
tctccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaa
cccgtgaccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctg
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccag
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaa
tcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc
ttcctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtg
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg
cataatgccaagacaaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctc
ccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc
ctgccccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacc
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
tggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag
aagagcctctccctgtctcccggcaaa
```

[Fig. 34-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H1  
(SEQ ID NO: 85)

```
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTF TNYVMHWVRQAPGQGLEW
MGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYSPLYFDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK
```

## ES 2 667 568 T3

[Fig. 35-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo M30-H2  
(SEQ ID NO: 86)

```
atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcag
ctggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaagggtcctgcaaggccagc
ggctacaccttcaccaactacgtgatgactgggtgcgccaggccccctgggcagggactggaatgg
atcggctacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgagaagttcaagggcagagtgacc
atcaccgccgacgagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcgagcagaggacacc
gccgtgtactactgcgccagatggggctactacggcagccccctgtactacttcgactactggggc
cagggcaccctggtgacagtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcacc
tctccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggctgctggtcaaggactacttccccgaa
cccgtgaccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctg
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccag
acctacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaa
tcttgtagaaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc
ttcctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgagggtcacatgctgtg
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg
cataatgccaagacaaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaagccctc
ccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc
ctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacc
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
tggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag
aagagcctctcctgtctcccggcaaa
```

[Fig. 35-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H2  
(SEQ ID NO: 87)

```
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVRQAPGQLEW
IGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYGSPLYYFDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK
```

## ES 2 667 568 T3

[Fig. 36-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo M30-H3  
(SEQ ID NO: 88)

```
atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcag
ctggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagc
ggctacaccttcaccaactacgtgatgactgggtgaaacaggccccctgggcagggcctggaatgg
atcggctacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgagaagttcaagggcaaggccacc
atcaccgccgacgagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcgagcgaggacacc
gccgtgtactactgcccagatggggctactacggcagccccctgtactacttcgactactggggc
cagggcaccctggtgacagtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcacc
tcctccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaa
cccgtgaccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctg
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccag
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaa
tcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc
ttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtccatgctg
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg
cataatgccaagacaaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggttccaacaaagccctc
ccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc
ctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacc
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
tggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag
aagagcctctccctgtctcccggcaaa
```

[Fig. 36-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H3  
(SEQ ID NO: 89)

```
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTNYVMHWVKQAPGQGLEW
IGYINPYNDVKYNEKFKGKATITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYGSPLYYFDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK
```

[Fig. 37-1]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo M30-H4  
(SEQ ID NO: 90)

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcag  
ctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagc  
ggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtcaagcaggccctgggcagggcctggaatgg  
atcggctacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgagaagttcaagggaaggccacc  
cagaccagcgacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcgagcgaggacacc  
gccgtgtactactgcgccagatggggctactacggcagccccctgtactacttcgactactggggc  
cagggcaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggccaagcgtcttccccctggcacc  
tctccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggtgctgctggtcaaggactacttccccgaa  
cccgtgaccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctg  
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccag  
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaa  
tcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc  
ttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtg  
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg  
cataatgccaagacaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctc  
accgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctc  
ccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc  
ctgccccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttc  
tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacc  
cctccccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg  
tggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag  
aagagcctctccctgtctcccggcaaa

[Fig. 37-2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H4  
(SEQ ID NO: 91)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTNYVMHWVKQAPGQGLEW  
IGYINPYNDVKEYNEKFKGKATQTSKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYIGSPLYYFDYWG  
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[Fig. 38]

