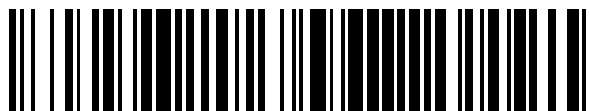


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 847**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)	C12N 5/10	(2006.01)	A61K 45/06	(2006.01)
A61K 31/337	(2006.01)	C12P 21/08	(2006.01)		
A61K 31/475	(2006.01)	A61K 31/439	(2006.01)		
A61K 39/395	(2006.01)	A61K 31/4545	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)	A61K 31/4745	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)	A61K 31/513	(2006.01)		
C07K 16/28	(2006.01)	A61K 31/555	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)	C07K 14/705	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)	C07K 16/30	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)	A61K 39/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011** **E 15200394 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** **EP 3020812**

54 Título: **Nuevo anticuerpo anti-DR5**

30 Prioridad:

29.10.2010 JP 2010243549

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

13.07.2018

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi- Honcho
Chuo-ku, Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**OHTSUKA, TOSHIAKI;
TAKIZAWA, TAKESHI;
OGUNI, AKIKO;
MATSUOKA, TATSUJI;
YOSHIDA, HIROKO y
MATSUI, YUMI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 675 847 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

Nuevo anticuerpo anti-DR5

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a un receptor de la superficie celular implicado en la inducción de la apoptosis y que es útil como un agente terapéutico y/o preventivo de tumores y también se refiere al anticuerpo para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o prevención del cáncer.

Técnica anterior

10 La apoptosis es un fenómeno esencial en el proceso fisiológico para eliminar células innecesarias o dañadas y mantener el número de células normales *in vivo*. Debido a avances que han aclarado el hecho de que el mecanismo regulador de la apoptosis a menudo está deteriorado en enfermedades cancerosas o inmunitarias y también al esclarecimiento de la ruta reguladora de la apoptosis, el desarrollo de un nuevo inductor de la apoptosis que pueda usarse en el tratamiento del cáncer o de enfermedades inmunitarias ha progresado. En particular, se espera que un anticuerpo, que tiene una afinidad de unión por un ligando por un receptor de la superficie celular implicado en la inducción de la apoptosis, representado por un receptor de muerte o un anticuerpo, que tiene una afinidad de unión
15 por dicho receptor de muerte, tenga un efecto terapéutico sobre estas enfermedades (véase, por ejemplo, el documento 1 no de patente). Se conoce el receptor de muerte 5 (DR5), que es uno de los receptores de muerte algunas veces denominado también KILLER, TRICK 2A, TRAIL-R2, TRICK B o CD262, y una pluralidad de anticuerpos agonistas que inducen la apoptosis en células (véase, por ejemplo, el documento 2 o 3 no de patente o los documentos 1 a 6 de patente). Algunos anticuerpos están desarrollándose actualmente en ensayos clínicos
20 como agentes terapéuticos candidatos y se espera que tengan un efecto terapéutico de tal manera que los anticuerpos actúen específicamente de una manera agonista en las células (células cancerosas o células relacionadas con enfermedades inmunitarias) que expresan el receptor para destruir las células. Para que dicho anticuerpo tenga un efecto antitumoral, es esencial que las células expresen DR5, sin embargo, se ha revelado que no existe correlación entre el efecto y el nivel de expresión de DR5 en un ensayo preclínico (documento 4 no de
25 patente). Se considera que esto es debido a una respuesta celular regulada por muchos factores tales como el nivel de expresión de moléculas de señalización intracelular (tales como caspasa-8 o Bcl-2) implicadas en las rutas de apoptosis (documento 5 no de patente).

Documentos de la técnica anterior

30 [Documento 1 de patente] WO 98/51793
[Documento 2 de patente] WO 2001/83560
[Documento 3 de patente] WO 2002/94880
[Documento 4 de patente] WO 2003/54216
[Documento 5 de patente] WO 2006/83971
[Documento 6 de patente] WO 2007/22157
35 [Documento 1 no de patente] Cell Death and Differentiation, 10: 66-75 (2003)
[Documento 2 no de patente] Journal of Immunology, 162: 2597-2605 (1999)
[Documento 3 no de patente] Nature Medicine, 7(8): 954-960 (2001)
[Documento 4 no de patente] Cell Death and Differentiation, 10: 66-75 (2003)
40 [Documento 5 no de patente] Journal of Clinical Oncology, 26: 3621-3630 (2008)

Sumario de la invención**[Problemas que la invención va a resolver]**

Un objeto de la invención es proporcionar un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo para usar como un agente farmacéutico que tenga un efecto terapéutico sobre el cáncer.

[Medios para resolver los problemas]

45 Los autores de la presente invención han hecho estudios intensos para conseguir el objeto anterior, y como resultado, descubrieron un anticuerpo que presentaba una fuerte actividad inductora de la apoptosis en las células y por tanto se completaba la invención. También se produjo un efecto terapéutico eficaz en pacientes en los que, con los anticuerpos disponibles en la actualidad, no podía obtenerse un efecto terapéutico suficiente.

50 Por tanto, la invención incluye las siguientes invenciones.

(1) Un anticuerpo anti-DR5, o un fragmento funcional del mismo, que tiene actividad de unión antigénica caracterizado porque contiene:

(a) una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

- a1) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 34;
a2) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 36;
5 a3) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 38;
a4) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 40;
10 a5) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 44;
a6) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46;
a7) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48;
15 a8) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 50;

(b) una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

- 20 b1) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28;
b2) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30;
b3) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 32;
25 b4) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52;
b5) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58;
30 b6) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62;
b7) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66.

(2) El anticuerpo anti-DR5, o un fragmento funcional del mismo, que tiene actividad de unión antigénica, de acuerdo con (1), caracterizado porque contiene: i) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 34 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 28, 30 y 32; ii) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 36 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 28, 30 y 32; iii) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 38 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 28, 30 y 32; iv) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 40 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; v) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 44 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; vi) una secuencia de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46 y una secuencia de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; vii) una secuencia de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48 y una secuencia de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; viii) una secuencia de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 50 y una secuencia de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28.

(3) El fragmento funcional del anticuerpo anti-DR5, que tiene actividad de unión antigénica, de acuerdo con (1) o (2), que se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab' y Fv.

(4) Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende al menos uno de los anticuerpos anti-DR5, o fragmentos funcionales de los mismos, que tienen actividad de unión antigénica, de acuerdo con (1) a (3).

(5) La composición farmacéutica de acuerdo con (4), caracterizada por ser una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.

(6) Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, caracterizada porque comprende (i) al menos uno de los anticuerpos anti-DR5, o fragmentos funcionales de los mismos, que tienen actividad de unión antigénica, de acuerdo con (1) a (3); y (ii) al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11 y vinblastina.

(7) La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con (5) o (6), en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de útero, melanoma, glioblastoma y cáncer de células sanguíneas.

(8) Un anticuerpo anti-DR5, o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica, de acuerdo con una cualquiera de (1) a (3) para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.

(9) Un anticuerpo anti-DR5, o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3) para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, caracterizado por la administración simultánea o secuencial del anticuerpo, o fragmento funcional que tiene actividad de unión antigénica, y al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11, vinblastina y 5-FU.

(10) Un producto seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11, vinblastina y 5-FU para su uso en el tratamiento y/o prevención de cáncer caracterizado por la administración simultánea o secuencial de un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que tiene actividad de unión antigénica, de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3).

(11) El anticuerpo o producto para su uso de acuerdo con uno cualquiera de (8) a (10), en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de útero, melanoma, fibrosarcoma, glioblastoma y cáncer de células sanguíneas.

[Ventaja de la invención]

De acuerdo con la invención, puede obtenerse un agente terapéutico para el cáncer, cuyo mecanismo de acción es principalmente a través de la inducción de la apoptosis en las células.

Breve descripción de las figuras

[Fig. 1]

La Fig. 1 es una figura que muestra el efecto citocida de un anticuerpo B273 de ratón.

[Fig. 2]

La Fig. 2 es una figura que muestra actividades de unión de un anticuerpo cB273 y sTRAIL contra una proteína de dominio extracelular de DR5.

[Fig. 3]

La Fig. 3 es una figura que muestra la actividad de unión de un anticuerpo cB273 contra DR5 humano usando Biacore. En la parte superior de la figura, se muestra un gráfico de medición, en el que el eje de las ordenadas representa unidades de resonancia (UR) y el de las abscisas representa el tiempo (segundos). En la parte inferior de la figura, se muestran los valores Kon, Koff, y KD del anticuerpo cB273 calculados usando análisis de programación informática.

[Fig. 4]

La Fig. 4 es una figura que muestra el efecto citocida *in vitro* de un anticuerpo cB273 en líneas celulares de cáncer humano. A) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de ovario humano, B) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de colon humano, C) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de pulmón humano y D) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de mama humano.

[Fig. 5]

La Fig. 5 es una figura que muestra el efecto citocida *in vitro* de un anticuerpo cB273 en líneas celulares de cáncer humano. A) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de páncreas humano, B) muestra los resultados de una línea celular de melanoma humano, C) muestra los resultados de una línea celular de glioblastoma humano y D) muestra los resultados de una línea celular de cáncer endometrial humano.

[Fig. 6]

La Fig. 6 es una vista que muestra una estructura del complejo DR5-cB273 Fab.

[Fig. 7]

La Fig. 7 es una vista que muestra la interacción entre DR5 y la cadena H o L de cB273 Fab. A) es una vista que ilustra los restos de aminoácidos de la cadena H de cB273 Fab que se sitúa a una distancia de 4 Å o menor de DR5 y viceversa como un modelo de barra. Ile34, Glu36, Asp37, Gly38, Asp56, Leu57, Leu58, Phe59, Leu61 y Arg62 mostrados en el lado izquierdo del dibujo son restos de aminoácidos procedentes de DR5 y los números de restos de aminoácidos respectivos corresponden a los de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias. Además, Phe33, Arg50, Asn52, Tyr54, Asn55, Phe59, Tyr101, Tyr102, Phe103 y Asp104 en el lado derecho del dibujo son restos de aminoácidos procedentes de la cadena

pesada de cB273, y los números de restos de aminoácidos respectivos se proporcionan usando un resto de ácido glutámico en la posición 20 de la SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias como un punto de partida. B) es una vista que ilustra restos de aminoácidos de la cadena L de cB273 Fab que se sitúa a una distancia de 4 Å o menor de DR5 y viceversa con algunos como un modelo de barra y otros como un modelo de cinta. Gly26, Glu36, Asp37, y Gly38 del lado izquierdo del dibujo son restos de aminoácidos procedentes de DR5, y los números de restos de aminoácidos respectivos corresponden a los de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias. Además, His31, Asn33, Val99, y Trp101 en el lado derecho del dibujo son restos de aminoácidos procedentes de la cadena ligera de cB273, y los números de restos de aminoácidos respectivos se proporcionan usando un resto de ácido aspártico en la posición 21 de la SEC ID NO: 16 en el Listado de Secuencias como un punto de partida. Los restos de aminoácidos de DR5 que se encuentran a una distancia de 4 Å o menor desde el fragmento Fab de cB273 son un resto de glicina en la posición 26, un resto de isoleucina en la posición 34, un resto de ácido glutámico en la posición 36, un resto de ácido aspártico en la posición 37, un resto de glicina en la posición 38, un resto de ácido aspártico en la posición 56, un resto de leucina en la posición 57, un resto de leucina en la posición 58, un resto de fenil alanina en la posición 59, un resto de leucina en la posición 61 y un resto de arginina en la posición 62 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 en el Listado de secuencias.

[Fig. 8-1]

La Fig. 8-1 es una figura que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con DR5 humano usando Biacore, y muestra gráficos de medición para los anticuerpos respectivos.

[Fig. 8-2]

La Fig. 8-2 es una tabla que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con DR5 humano usando Biacore, y muestra los valores de Kon, Koff y KD de los anticuerpos respectivos calculados usando análisis de programación informática. Por otro lado, el número dado en cada gráfico en la Fig. 8-1 corresponde al N° de entrada de la tabla de la Fig. 8-2.

[Fig. 9]

La Fig. 9 es una figura que muestra la actividad citocida *in vitro* de anticuerpos hB273 contra células Jurkat, que son una línea celular procedente del linfoma T humano.

[Fig. 10-1]

La Fig. 10-1 es una figura que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con DR5 humano usando Biacore, y muestra gráficos de medición de los anticuerpos respectivos.

[Fig. 10-2]

La Fig. 10-2 es una tabla que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con DR5 humano usando Biacore, y muestra los valores Kon, Koff y KD de los anticuerpos respectivos calculados usando análisis de programación informática. Por otro lado, el número dado en cada gráfico en la Fig. 10-1 corresponde al N° de entrada de la tabla de la Fig. 10-2.

[Fig. 11]

La Fig. 11 es una figura que muestra la actividad citocida *in vitro* de anticuerpos hB273 contra células Jurkat que son una línea celular procedente de linfoma T humano.

[Fig. 12-1]

La Fig. 12-1 es una vista que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con CDR modificada contra DR5 humano usando Biacore, y muestra gráficos de medición de los anticuerpos respectivos.

[Fig. 12-2]

La Fig. 12-2 es una tabla que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con CDR modificada contra DR5 humano usando Biacore y muestra los valores Kon, Koff y KD de los anticuerpos respectivos calculados usando análisis de programación informática. Por otro lado, el número dado en cada gráfico en la Fig. 12-1 corresponde al N° de entrada de la tabla de la Figura 12-2.

[Fig. 13-1]

La Fig. 13-1 es una figura que muestra la evaluación de la estabilidad térmica de anticuerpos hB273 con CDR modificada usando calorimetría diferencial de barrido (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) y muestra gráficos de medición de los anticuerpos respectivos.

[Fig. 13-2]

La Fig. 13-2 es una figura que muestra la evaluación de la estabilidad térmica de anticuerpos hB273 con CDR modificada usando calorimetría diferencial de barrido (DSC) y muestra gráficos de medición de los anticuerpos respectivos.

[Fig. 13-3]

La Fig. 13-3 muestra valores Tm de los anticuerpos respectivos calculados a partir de los gráficos mostrados en las Figs. 13-1 y 13-2. Dicho sea de paso, el número dado en cada gráfico en las Figs. 13-1 y 13-2 corresponde al N° de entrada de la Figura 13-3.

[Fig. 14]

La Fig. 14 es una figura que muestra las actividades citocidas *in vitro* de anticuerpos hB273 con CDR modificada contra células Jurkat que son una línea celular procedente de linfoma T humano.

[Fig. 15]

La Fig. 15 es una vista que muestra el efecto de activación de caspasa-3/7 en la actividad citocida *in vitro* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK en líneas celulares de cáncer humano. A) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 y B) muestra los resultados de una línea celular de glioblastoma humano U-87MG.

[Fig. 16]

La Fig. 16 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano COLO 205 implantada.

[Fig. 17]

5 La Fig. 17 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de páncreas humano MIAPaCa-2 implantada.

[Fig. 18]

La Fig. 18 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de glioblastoma humano U-87MG implantada.

10 [Fig. 19]
La Fig. 19 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de células de cáncer de pulmón humano NCI-H2122 implantada (en combinación con paclitaxel y carboplatino).

[Fig. 20]

15 La Fig. 20 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H460 implantada (en combinación con paclitaxel y carboplatino).

[Fig. 21]

20 La Fig. 21 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano DLD-1 implantada (en combinación con CPT-11).

[Fig. 22]

La Fig. 22 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 implantada (en combinación con CPT-11).

[Fig. 23]

25 La Fig. 23 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano HCT-116 implantada (en combinación con CPT-11).

[Fig. 24]

La Fig. 24 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de melanoma humano A375 implantada (en combinación con vinblastina).

30 [Fig. 25]

La Fig. 25 es una figura que muestra una comparación de la actividad antitumoral *in vivo* en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 implantada entre un anticuerpo cB273 y conatumumab.

[Fig. 26]

35 La Fig. 26 es una figura que muestra una comparación de la actividad antitumoral *in vivo* en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H1975 implantada entre un anticuerpo cB273 y conatumumab.

[Fig. 27]

40 La Fig. 27 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK (indicado como "hB273" en el dibujo) en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano COLO 205 implantada.

[Fig. 28]

La Fig. 28 es una figura que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón.

45 [Fig. 29]

La Fig. 29 es una figura que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón.

[Fig. 30]

50 La Fig. 30 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo quimera de B273 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo quimera de B273.

[Fig. 31]

La Fig. 31 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo quimera de B273 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo quimera de B273.

[Fig. 32]

55 La Fig. 32 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1.

[Fig. 33]

La Fig. 33 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L2 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L2.

60 [Fig. 34]

La Fig. 34 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L3 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L3.

[Fig. 35]

65 La Fig. 35 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H1.

[Fig. 36]

La Fig. 36 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2.

[Fig. 37]

5 La Fig. 37 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H3 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H3.

[Fig. 38]

La Fig. 38 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H1-1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H1-1.

[Fig. 39]

10 La Fig. 39 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-1.

[Fig. 40]

La Fig. 40 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-2 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-2.

15 [Fig. 41]

La Fig. 41 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-3 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-3.

[Fig. 42]

20 La Fig. 42 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-4 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-4.

[Fig. 43]

La Fig. 43 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-5 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-5.

[Fig. 44]

25 La Fig. 44 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L1-NE y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NE.

[Fig. 45]

La Fig. 45 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L1-NF y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NF.

30 [Fig. 46]

La Fig. 46 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L1-NK y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NK.

[Fig. 47]

35 La Fig. 47 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L1-NL y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NL.

[Fig. 48]

La Fig. 48 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE.

[Fig. 49]

40 La Fig. 49 es una figura que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una cadena ligera de conatumumab y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de conatumumab.

[Fig. 50]

La Fig. 50 es una figura que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una cadena pesada de conatumumab y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de conatumumab.

45 [Fig. 51]

La Fig. 51 es una figura que muestra la actividad citocida *in vitro* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK contra líneas celulares de cáncer humano A) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de estómago humano, B) muestra los resultados de una línea celular de cáncer renal humano, C) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de hígado humano y D) muestra los resultados de una línea celular de fibrosarcoma humano.

[Fig. 52]

La Fig. 52 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK (indicado como "hB273" en el dibujo) en combinación con 5-FU en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 implantada y una comparación de la actividad con conatumumab.

55 [Fig. 53]

La Fig. 53 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK (indicado como "hB273" en el dibujo) en combinación con paclitaxel en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H1975 implantada y una comparación de la actividad con conatumumab

60

[Modo de realizar la invención]

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

El término "gen" como se usa en el presente documento incluye no solo ADN, sino también ARNm del mismo, ADNc

y ARNc del mismo.

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

Los términos “polipéptido” y “proteína” como se usan en el presente documento se usan sin distinción.

5 La expresión “fracción de ARN”, como se usa en el presente documento se refiere a una fracción que contiene ARN.

El término “célula” como se usa en el presente documento también incluye células en un individuo animal y células cultivadas.

10 El término “transformación maligna de células”, como se usa en el presente documento, se refiere a un estado en el que las células muestran proliferación anómala, por ejemplo, células que pierden su sensibilidad al ponerse en contacto con un fenómeno de inhibición, células que muestran proliferación independiente de anclaje, y etcétera, y las células que muestran dicha proliferación anómala se denominan “células cancerosas”.

15 La expresión “lesión celular”, como se usa en el presente documento, se refiere a un estado en el que se produce un cambio patológico en las células, en una forma de algún tipo y la lesión celular no está limitada a lesión directa, e incluye todos los tipos de daños en la estructura y función de las células, tal como escisión de ADN, formación de bases-dímeros, escisión cromosómica, daño en la máquina de la división celular y una disminución en diversas actividades enzimáticas.

La expresión “actividad citotóxica” como se usa en el presente documento se refiere a una actividad de causa de la lesión celular descrita anteriormente.

20 La expresión “receptor que contiene un dominio de muerte” (que incluye Fas, TNFRI, DR3, DR4, DR5, y DR6, aunque sin limitarse a los mismos) como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula receptora que tiene una región de transducción de señal apoptótica denominada “dominio de muerte” que muestra homología con el gen suicida *reaper* (segador) de *Drosophila* en un dominio intracelular.

25 La expresión “fragmento funcional de un anticuerpo” como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento parcial de un anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica e incluye Fab, F(ab')₂ y scFv. El término también incluye Fab' que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenida por tratamiento de F(ab')₂ en condiciones reductoras. Sin embargo, la expresión no está limitada a estas moléculas siempre que el fragmento tenga una afinidad de unión por un antígeno. Adicionalmente, estos fragmentos funcionales no solo incluyen un fragmento obtenido por tratamiento de una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima apropiada, sino también una proteína producida en una célula hospedadora apropiada usando un gen de anticuerpo modificado genéticamente.

30 El término “Fab” como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenida tratando F(ab')₂ en condiciones reductoras como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, el Fab' producido usando un gen de anticuerpo modificado genéticamente también se incluye dentro del Fab' de la invención.

35 La expresión “anticuerpo de fragmento variable monocatenario” como se usa en el presente documento se usa con el mismo significado que un Fv monocatenario (scFv, *single chain* Fv).

40 El término “epítipo” como se usa en el presente documento se refiere a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial de un antígeno al cual se une un anticuerpo específico. El epítipo que es un péptido parcial de un antígeno puede determinarse por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, 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, se produce una serie de polipéptidos que tienen longitudes apropiadamente reducidas obtenidas acortando secuencialmente el antígeno del extremo C o del extremo N, usando una técnica de recombinación genética conocida por los expertos en la técnica. Después de esto, se examina la reactividad de un anticuerpo contra estos polipéptidos y en líneas generales se determina un sitio de reconocimiento. Después, los péptidos que tienen longitudes más cortas se sintetizan y se examina la reactividad con estos péptidos, mediante lo cual el epítipo puede determinarse. Adicionalmente, el epítipo que es una estructura terciaria parcial de una unión antigénica con un anticuerpo específico puede determinarse por especificación de los restos de aminoácidos del antígeno que se sitúa adyacente al anticuerpo mediante análisis estructural de rayos X.

50 La expresión “anticuerpos que se unen al mismo epítipo” 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 cual se une un primer anticuerpo, puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo. Además, confirmando que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión con un antígeno (es decir, el segundo anticuerpo inhibe la unión entre el primer anticuerpo y el antígeno), puede determinarse en el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo

epítopo incluso si la secuencia o estructura epitópica específica no se ha determinado. Además, cuando el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítopo y también el primer anticuerpo tiene un efecto especial tal como una actividad inductora de la apoptosis, puede esperarse que el segundo anticuerpo tenga también la misma actividad.

5 El término “CDR” 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 dominio hipervariable, y está presente en una región variable de cada cadena pesada y ligera de un anticuerpo. Se trata de un sitio que tiene inusualmente alta variabilidad en su estructura primaria y hay tres CDR distintas en la estructura primaria de cada
10 cadena polipeptídica pesada y ligera. En esta memoria descriptiva, al igual que para las CDR de un anticuerpo, las CDR de la cadena pesada se representan 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 se representan 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 por un antígeno al cual se une el anticuerpo.

15 La expresión “anticuerpo secundario” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a una molécula de anticuerpo, entrecruzándose de este modo las moléculas de anticuerpo.

La frase “la hibridación se realiza en condiciones rigurosas” como se usa en el presente documento se refiere a un proceso en el la hibridación se realiza en condiciones en las que la identificación puede efectuarse realizando la hibridación a 68 °C en una solución de hibridación disponible en el comercio, la solución de hibridación ExpressHyb
20 (fabricada por Clontech, Inc.) o realizando la hibridación a 68 °C en presencia de NaCl de 0,7 a 1,0 M, usando un filtro que tenga ADN inmovilizado en su interior, seguido por un lavado a 68 °C usando una solución de 0,1 a 2 x SSC (la solución 1 x SSC está compuesta por NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) o en condiciones equivalentes a las mismas.

La expresión “varios aminoácidos” en la descripción de “una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, deleción o adición de uno a varios aminoácidos” como se usa en el presente documento se refiere a un número arbitrario de restos de aminoácidos seleccionados de 2 a 10. Más específicamente, cuando se sustituyen, se delecionan o se añaden 10 o menos aminoácidos, de 5 a 6 o menos aminoácidos, o de 2 a 3 o menos aminoácidos, se usa la descripción de “una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, deleción o adición de diversos aminoácidos”.

La descripción de, por ejemplo, “una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la SEQ ID NO: 34” como se usa en el presente documento se usa con el mismo significado que la descripción de “una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la SEQ ID NO: 34”. Además, la descripción de, por ejemplo, “una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID
35 NO: 34” se usa con el mismo significado que la descripción de “una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 34”.

1. Relaciones de genes relacionados con la apoptosis

Se requiere un anticuerpo de acuerdo con la invención para unirse a un antígeno específico y exhibir una actividad citotóxica mediante el antígeno. Además, para impedir que las células normales se destruyan, es necesario
40 seleccionar el antígeno específicamente presente en células tumorales. Un ejemplo de dicho grupo antigénico puede incluir grupos receptores de ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (en lo sucesivo denominado “TNF” en la memoria descriptiva) (en lo sucesivo denominado “TRAIL” en la memoria descriptiva). TRAIL es un miembro de la familia de proteínas de TNF e incluye ligandos Fas y TNF- α (Wiley SR, y col., Immunity 1995 diciembre; 3 (6): 673-82). Estas proteínas son fuertes factores inductores de la apoptosis.

45 Los receptores de esta familia de proteínas de TNF se caracterizan por secuencias repetidas ricas en cisteína en el dominio extracelular. Entre estos, Fas que es un receptor para ligandos Fas, y el receptor I de TNF (en lo sucesivo, denominado “TNFRI” en la memoria descriptiva) que es un receptor de TNF α , tienen en un dominio intracelular, una región esencial para la transducción de señal apoptótica, denominado “dominio de muerte”, que es una región que muestra homología con el gen suicida *reaper* de *Drosophila* (Golstein, P., y col., (1995) Cell. 81, 185-186; y White, K, y col., (1994) Science 264, 677-683) y en su conjunto se denominan receptores que contienen el dominio de muerte.

Se han identificado cinco receptores para TRAIL, entre estos, dos receptores (DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2)) tienen la capacidad de transducir una señal apoptótica y los otros tres receptores (DcR1 (TRAIL -R3), DcR2 (TRAIL-R4) y la osteoprotegerina (OPG)) no transducen ninguna señal apoptótica. De manera similar a Fas y a TNFRI, tanto DR4 como DR5 incluyen un dominio de muerte en un segmento intracelular y transducen una señal apoptótica
55 mediante una ruta que contiene una proteína del dominio de muerte asociado a Fas (en lo sucesivo denominado “FADD” en la memoria descriptiva) y caspasa 8 (Chaudhary PM, y col., Immunity 1997 diciembre; 7 (6): 813-20; y Schneider P, y col. Immunity 1997 diciembre; 7 (6): 821-30). Se sabe que, para Fas, TNFRI, DR4 o DR5 descritos anteriormente, un anticuerpo que se une a cualquiera de estas moléculas y funciona como un agonista, exhibe una

actividad inductora de apoptosis contra células portadoras de la molécula en la superficie celular (Journal of Cellular Physiology, 209: 1221-1028 (2006); Leukemia, Apl; 21 (4): 805-812 (2007); Blood, 99: 1666-1675 (2002); y Cellular Immunology, enero; 153 (1): 184-193 (1994)). El efecto farmacológico del anticuerpo agonista descrito anteriormente se potencia entrecruzándose con un anticuerpo secundario o una célula efectora (Journal of Immunology, 149: 3166-3173 (1992); y European Journal of Immunology, octubre; 23 (10): 2676-2681 (1993)).

La secuencia de nucleótidos de un gen DR5 (receptor 5 de muerte) humano y su secuencia de aminoácidos se han registrado como GI: 22547118 (nº de registro: NM_147187) en el GenBank. Por otro lado, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección o adición de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de DR5, y que también tiene una actividad biológica equivalente a la de DR5, también se incluye dentro del significado de la expresión "secuencia de nucleótidos del gen DR5". Además, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección o adición de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de DR5 y que también tiene actividad biológica equivalente a la de DR5, también se incluye dentro del significado del término "DR5".

2. Producción del anticuerpo anti-DR5

El anticuerpo contra DR5 puede obtenerse inmunizando a un animal con DR5 o con un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de DR5 y recogiendo y purificando el anticuerpo producido *in vivo* de acuerdo con un procedimiento habitual. La especie biológica de DR5 a usar como un antígeno no está limitada a la especie humana, y puede inmunizarse a un animal con un DR5 procedente de un animal que no sea un ser humano, tal como un ratón o una rata. En este caso, examinando la reactividad cruzada entre un anticuerpo que se une al DR5 heterólogo obtenido y el DR5 humano, puede seleccionarse un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Adicionalmente, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal fusionando células productoras de anticuerpo, que producen un anticuerpo contra DR5, con células de mieloma para establecer un hibridoma de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, (1975) 256, págs. 495-497, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, págs. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)).

Por otro lado, el DR5 a usar como un antígeno puede obtenerse a través de modificación por ingeniería genética para hacer que una célula hospedadora exprese un gen de DR5.

Específicamente, se produce un vector con capacidad para expresar un gen de DR5, y el vector resultante se transfecta en una célula hospedadora para expresar el gen, y después el gen de DR5 expresado se purifica. En lo sucesivo en el presente documento, se describirá específicamente un procedimiento de obtención de un anticuerpo contra DR5.

(1) Preparación de antígeno

Los ejemplos del antígeno a usar para la producción del anticuerpo anti-DR5 incluyen DR5, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos parcial que contiene al menos 6 aminoácidos consecutivos de DR5, y un derivado obtenido añadiendo una secuencia de aminoácidos dada o un transportador de la misma.

DR5 puede purificarse directamente de tejidos tumorales humanos o de células tumorales humanas y usarse. Además, DR5 puede obtenerse sintetizándolo *in vitro* o haciendo que lo produzca una célula hospedadora a través de modificación por ingeniería genética.

Con respecto a la modificación por ingeniería genética, específicamente, el ADNc de DR5 se integra en un vector con capacidad de expresar ADNc de DR5 y DR5 se sintetiza en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requerida para la transcripción y traducción, u otra célula hospedadora procariota o eucariota se transforma para expresar DR5, por lo cual puede obtenerse el antígeno.

Adicionalmente, el antígeno también puede obtenerse como una proteína secretora, expresando una proteína de fusión obtenida uniendo el dominio extracelular de DR5, que es una proteína de membrana, con la región constante de un anticuerpo en un sistema de hospedador-vector apropiado.

El ADNc de DR5 puede obtenerse, por ejemplo, a través del procedimiento denominado de PCR en el que se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo en el presente documento "PCR") usando una biblioteca de ADNc que, como molde, contiene ADNc de DR5 y cebadores que amplifican específicamente el ADNc de DR5 (véase Saiki, RK, y col., Science, (1988) 239, págs. 487-489).

En cuanto al sistema para la síntesis *in vitro* del polipéptido, puede servir de ejemplo, pero sin limitación, el sistema de traducción rápida (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc.

Los ejemplos de células hospedadoras procariotas incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para transformar la célula hospedadora con un gen diana, la célula hospedadora se transforma usando un vector plasmídico que contiene un replicón, es decir, un origen de replicación procedente de una especie compatible con el hospedador y

una secuencia reguladora. Además, el vector tiene preferentemente una secuencia con capacidad de imponer selectividad fenotípica en la célula transformada.

Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas incluyen, células de vertebrado, células de insecto y células de levadura. En cuanto a células de vertebrado, con frecuencia se utilizan, por ejemplo, cepas con déficit de dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, págs. 4126-4220) de células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos NIH3T3 murinos (ATCC n.º CRL-1658) y células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61), sin embargo, no están limitadas a las mismas.

El transformante así obtenido puede cultivarse de acuerdo con un procedimiento habitual, y a través del cultivo del transformante, se produce un polipéptido diana de manera intracelular o extracelular.

Para el cultivo puede utilizarse un medio adecuado que, dependiendo de la célula hospedadora empleada, puede seleccionarse de los diversos medios de cultivo habitualmente utilizados. Si se emplea *Escherichia coli*, por ejemplo, puede usarse medio LB complementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG si fuera necesario.

Una proteína recombinante producida de manera intracelular o extracelular por el transformante a través de dicho cultivo puede separarse y purificarse a través de cualquiera de los diversos procedimientos de separación conocidos utilizando una propiedad física o química característica de la proteína.

Los ejemplos específicos de los procedimientos incluyen el tratamiento con un precipitante de proteínas habitual, ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida, tal como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, diálisis y una combinación de las mismas.

Adicionalmente, fijando una etiqueta de seis restos de histidina a la proteína recombinante a expresar, la proteína puede purificarse de un modo eficaz con una columna de afinidad de níquel. Como alternativa, fijando una región Fc de IgG a una proteína recombinante a expresar, la proteína puede purificarse de un modo eficaz con una columna de proteína A.

Combinando los procedimientos descritos anteriormente, puede producirse fácilmente una gran cantidad de un polipéptido diana a alto rendimiento y con una pureza elevada.

(2) Producción de anticuerpos monoclonales anti-DR5

Los ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente a DR5 incluyen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a DR5 y un procedimiento de obtención del anticuerpo es como se describe más adelante.

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

- (a) purificación de un biopolímero a usar como un antígeno;
- (b) preparación de células productoras de anticuerpos inmunizando a un animal a través de inyección del antígeno, recogida de la sangre y ensayo del título de sus anticuerpos para determinar cuándo extraer el bazo;
- (c) preparación de células de mieloma (en lo sucesivo en el presente documento denominada "mieloma");
- (d) fusión de las células productoras de anticuerpo con el mieloma;
- (e) exploración de un grupo de hibridomas productores de un anticuerpo diana;
- (f) división de los hibridomas en clones celulares sencillos (clonación);
- (g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal al cual se le ha implantado el hibridoma, para producir una gran cantidad de un anticuerpo monoclonal;
- (h) examinar la actividad biológica y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal así producido, o someter a ensayo las propiedades del mismo como un reactivo marcado.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá con detalle el procedimiento de producción de un anticuerpo monoclonal siguiendo las etapas anteriores, sin embargo, el procedimiento no está limitado a estas y, por ejemplo, pueden usarse células productoras de anticuerpos que no sean esplenocitos ni mieloma.

(a) Purificación del antígeno

Como antígeno puede usarse un DR5 preparado por el procedimiento descrito anteriormente o un péptido parcial del mismo.

Además, como antígeno también puede usarse una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresan DR5 o de las células recombinantes que en sí mismas expresan DR5, y también a partir de un péptido parcial de la proteína desvelada en el presente documento sintetizado químicamente a través de un procedimiento conocido por los expertos en la técnica.

(b) Preparación de células productoras de anticuerpos

- El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, con o sulfato de aluminio y fosfato y la mezcla resultante se usa como un inmunógeno para inmunizar a un animal experimental. Como animal experimental, puede utilizarse sin problemas cualquier animal utilizado en un procedimiento de producción de hibridoma. Específicamente, puede utilizarse, por ejemplo, un ratón, una rata, una oveja, una cabra, una vaca, un caballo, o similares. Sin embargo, desde el punto de vista de facilitar la existencia de células de mieloma para fusionar con las células productoras de anticuerpos extraídas, como animal a inmunizar se utiliza preferentemente un ratón o una rata.
- Además, la cepa de ratón o rata a usar no está particularmente limitada, y en el caso de un ratón, por ejemplo, pueden utilizarse 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 en el caso de una rata, por ejemplo, pueden utilizarse las cepas Wistar, Low, Lewis, Sprague Dawley, ACI, BN o Fischer.
- Entre estas, teniendo en cuenta la compatibilidad de la fusión con las células de mieloma, como se describe más adelante, como animal para inmunizar, en el caso de un ratón, particularmente se prefiere una cepa BALB/c y en el caso de una rata, se prefieren las cepas Wistar y Low.
- Además, teniendo en cuenta la homología antigénica entre seres humanos y ratones, también se prefiere el uso de un ratón que tenga una función biológica disminuida para eliminar los autoanticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmunitaria.
- La edad del ratón o de la rata en el momento de la inmunización es, preferentemente, de 5 a 12 semanas de vida, más preferentemente de 6 a 8 semanas de vida.
- Para inmunizar a un animal con DR5 o con una proteína recombinante del mismo, puede utilizarse, por ejemplo, un procedimiento conocido descrito con detalle, por ejemplo, en 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 similar.
- Las células productoras de anticuerpos, incluyendo, esplenocitos o linfocitos, se eliminan asépticamente del animal inmunizado. En este momento, el título del anticuerpo se mide, y si un animal tiene un título de anticuerpo suficientemente aumentado, se usa como una fuente de suministro de las células productoras de anticuerpos, pudiendo efectuarse el procedimiento posterior de un modo más eficaz.
- Los ejemplos del procedimiento de medición del título de anticuerpo a usar en el presente documento incluyen un procedimiento RIA y un procedimiento ELISA, pero el procedimiento no está limitado a estos.
- La separación de las células productoras de anticuerpos de los esplenocitos o linfocitos del animal inmunizado puede realizarse 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).
- (c) Células de mieloma (en lo sucesivo en el presente documento denominado "mieloma")
- Las células de mieloma a usar para la fusión celular no están particularmente limitadas y pueden seleccionarse células adecuadas de líneas celulares conocidas. Sin embargo, teniendo en cuenta la comodidad cuando se selecciona un hibridoma de células fusionadas, se prefiere el uso de una cepa con déficit de HGPRT (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se ha establecido.
- Más específicamente, como ejemplos de cepas con déficit de HGPRT se 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 (45.6G), F0, S149/5XXO, y BU.1 procedentes de ratones; 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3) procedente de ratas; y U266AR (SKO-007), GM1500-GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2) y 8226AR/NIP4-1 (NP41) procedentes de seres humanos.
- (d) Fusión celular
- La fusión entre las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma puede realizarse apropiadamente de acuerdo con un procedimiento conocido (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), etc.) en condiciones tales que el índice de supervivencia de las células no esté excesivamente reducido.
- Como un procedimiento de este tipo, puede utilizarse, por ejemplo, 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 una alta concentración, un procedimiento físico usando estimulación eléctrica, o similar.
- (e) Selección de un grupo de hibridomas

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

5 Este procedimiento es efectivo cuando se obtienen hibridomas usando las células de mieloma de una cepa con déficit de HGPRT que no puede sobrevivir en presencia de aminopterina.

Esto es, cultivando células e hibridomas no fusionados en medio HAT, solo sobreviven y proliferan de un modo selectivo hibridomas resistentes a aminopterina.

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

10 Como un procedimiento de clonación para hibridomas, puede utilizarse un procedimiento conocido tal como un procedimiento con metilcelulosa, un procedimiento con agarosa blanda 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 con metilcelulosa. Por ejemplo, el grupo de hibridomas producido por fusión celular se suspende en un medio con metilcelulosa, tal como Medio de Selección D de ClonaCell-HY (fabricado por StemCell Technologies, inc., n.º 03804) y se cultiva. Después, las colonias de hibridoma formadas se recogen, obteniéndose de este modo hibridomas monoclonales. Las colonias de hibridoma respectivas recogidas se cultivan, y un hibridoma que se ha confirmado que tiene un título de anticuerpo estable en un sobrenadante de cultivo de hibridoma obtenido se selecciona como una cepa de hibridoma productora de anticuerpos monoclonales DR5.

20 Los ejemplos de la cepa de hibridoma desvelada incluyen el hibridoma B273 de DR5. Por otro lado, en esta memoria descriptiva, un anticuerpo producido por el hibridoma B273 se denomina "anticuerpo B273" o simplemente "B273". La cadena pesada del anticuerpo B273 tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 en el Listado de Secuencias. Además, la cadena ligera del anticuerpo B273 tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias. Por otro lado, en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 8 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 142 a 465 es una región constante. Además, en la secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 133 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 134 a 238 es una región constante.

35 La secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 8 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7 en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena pesada del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 424 a 1395 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

40 La secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 9 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 9 en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 399 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 400 a 714 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.

(g) Preparación del anticuerpo monoclonal a través de cultivo de hibridoma

50 Cultivando el hibridoma así seleccionado, puede obtenerse de un modo eficaz un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, antes de cultivar, se prefiere realizar la exploración de un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal diana.

En dicha exploración, puede emplearse un procedimiento conocido.

La medición del título de anticuerpo en la invención puede realizarse, por ejemplo, a través de un procedimiento ELISA explicado en el apartado (b) descrito anteriormente.

55 El hibridoma obtenido a través del procedimiento anteriormente descrito, puede conservarse en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un refrigerador a una temperatura de -80 °C o inferior.

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

5 El cultivo a gran escala se realiza haciendo girar el cultivo usando un frasco de cultivo grande o a través de cultivo con agitación centrífuga. A partir del sobrenadante obtenido mediante el cultivo a gran escala, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína desvelada en el presente documento por purificación usando un procedimiento conocido por los expertos en la técnica, tal como filtración en gel.

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

10 En el caso en el que el hibridoma se administre en la cavidad abdominal, si antes de administrar el hibridoma (de 3 a 7 días antes) se administra un aceite mineral, tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristano), puede obtenerse una mayor cantidad de ascitis.

15 Por ejemplo, para inactivar linfocitos T previamente se inyecta un inmunosupresor en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que la del hibridoma. Veinte días después, se suspenden de 10^6 a 10^7 células de clones de hibridoma en un medio asérico (0,5 ml) y la suspensión se inyecta en la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen se expande y se llena con la ascitis, esta se extrae del ratón. Mediante este procedimiento, el anticuerpo monoclonal puede obtenerse a una concentración que es aproximadamente 100 veces o más alta que la de en la solución del cultivo.

20 El anticuerpo monoclonal obtenido a través del procedimiento descrito anteriormente puede purificarse a través de un procedimiento descrito, por ejemplo, en Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

El anticuerpo monoclonal obtenido de este modo tiene alta especificidad antigénica por DR5.

(h) Ensayo del anticuerpo monoclonal

El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal así obtenido puede determinarse de la siguiente manera.

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

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

30 Por otro lado, cuando se utiliza un procedimiento ELISA o RIA, directamente haciendo reaccionar el sobrenadante del cultivo con una fase sólida adsorbida al antígeno y utilizando anticuerpos que corresponden a diversos tipos de isotipos y subclases de inmunoglobulinas como anticuerpos secundarios, el isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal pueden identificarse.

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

35 Adicionalmente, la determinación cuantitativa de una proteína puede realizarse a través del procedimiento de Folin Lowry y de un procedimiento de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm [$1,4 \text{ (DO 280) = Inmunoglobulina 1 mg/ml}$].

40 Adicionalmente, incluso cuando el anticuerpo monoclonal se obtiene, por separado e independiente, realizando de nuevo las etapas (a) a (h) en el apartado (2) anterior, es posible obtener un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la de B273. Como un ejemplo de un anticuerpo de este tipo, puede servir de ejemplo un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo B273. Si un anticuerpo monoclonal recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la cual se une el anticuerpo B273, puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo B273. Adicionalmente, confirmando que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo B273 por la unión con DR5 (esto es, el anticuerpo monoclonal inhibe la unión entre el anticuerpo B273 y DR5), puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo B273 incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura epitópica específica. En el caso en el que el anticuerpo monoclonal se una al mismo epítipo que el anticuerpo B273, se espera firmemente que el anticuerpo monoclonal tenga una actividad citotóxica equivalente a la de B273.

45 Adicionalmente, como se observa en el Ejemplo 4, es posible especificar un resto de aminoácido en el lado de DR5 que se encuentra adyacente a un fragmento Fab de un anticuerpo a partir de los datos de difracción de rayos X de un complejo entre el fragmento Fab y DR5. Específicamente, en el caso en el que un fragmento Fab procedente de un anticuerpo arbitrario se encuentre adyacente a un resto de glicina en la posición 26, a un resto de isoleucina en la posición 34, a un resto de ácido glutámico en la posición 36, a un resto de ácido aspártico en la posición 37, a un resto de glicina en la posición 38, a un resto de ácido aspártico en la posición 56, a un resto de leucina en la posición 57, a un resto de leucina en la posición 58, a un resto de fenilalanina en la posición 59, a un resto de leucina en la

posición 61, y a un resto de arginina en la posición 62 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 en el listado de secuencias, a una distancia de 4 Å o menor, puede determinarse que el anticuerpo tiene especificidad por el mismo epitopo que B273.

(3) Otros anticuerpos

5 El anticuerpo desvelado en el presente documento no solo incluye el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente contra DR5 sino también un anticuerpo recombinante obtenido por 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 utilizando un procedimiento conocido.

10 Como anticuerpo quimérico, puede servir de ejemplo un anticuerpo en el que las regiones constante y variable del anticuerpo proceden de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en el que una región variable de anticuerpo procedente de ratón o de rata está unida a una región constante procedente de ser humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)). Un anticuerpo quimérico procedente de un anticuerpo de ratón anti-DR5 humano B273 es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 16, y puede tener una región constante arbitraria. Como un ejemplo de dicho anticuerpo quimérico, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias y puede servir de ejemplo una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21-239 de SEQ ID NO: 16. Por otro lado, en la secuencia de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 20 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 142 a 471 es una región constante. Además, en la secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 20 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 135 a 239 es una región constante.

20 La secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 19 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 19 en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena pesada del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 424 a 1413 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

25 La secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15 en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 60 codifica la secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 403 a 717 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.

30 Como anticuerpo humanizado, puede servir de ejemplo un anticuerpo obtenido integrando solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en un anticuerpo procedente de ser humano (véase Nature (1986) 321, págs. 522-525) y un anticuerpo obtenido injertando una parte de los restos de aminoácidos de la región marco conservada así como las secuencias CDR en un anticuerpo humano mediante un procedimiento de injertación de CDR (documento WO 90/07861).

35 Sin embargo, el anticuerpo humanizado procedente del anticuerpo B273 no está limitado a un anticuerpo humanizado específico siempre y cuando el anticuerpo humanizado tenga los 6 tipos de secuencias CDR de B273 y tenga la actividad de inducción de apoptosis en las células. Por otro lado, la región variable de cadena pesada del anticuerpo B273 tiene una CDRH1 (GYFMN) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 (RFNPNYNGDTFYNQKFKG) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 83, y una CDRH3 (SAYYFDSGGYFDY) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84. Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo B273 tiene una CDRL1 (RSSQSLVHNSGNTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 79 en el Listado de Secuencias, una CDRL2 (KVSNRFS) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y una CDRL3 (SQSTHVPWT) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81.

Adicionalmente, una secuencia que incluye la sustitución, delección o adición de uno a varios restos de aminoácidos

en una de las CDR descritas anteriormente puede usarse como una secuencia CDR que tiene un anticuerpo modificado en CDR procedente del anticuerpo B273. Los ejemplos de la secuencia que incluye una sustitución de un resto de aminoácido en la CDRL1 incluyen una secuencia (RSSQSLVHSNENTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 85 en el Listado de Secuencias, una secuencia (RSSQSLVHSNFNTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 86, una secuencia (RSSQSLVHSNKNTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 87, y una secuencia (RSSQSLVHSNLNTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 88. Además, los ejemplos de la secuencia que incluye una sustitución de un resto de aminoácido en la CDRH2 incluyen una secuencia (RFNPYNEDTFYNQKFKG) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89.

En general, la desamidación de asparagina en una proteína avanza a través de la formación de un estado de transición de succinimida cíclica entre la asparagina y un aminoácido adyacente en el lado C terminal (Geiger, T. y Clarke, S. (1987) Deamidation, Isomerization, and racemization at asparaginy and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J. Biol. Chem.* 262, 785-794). Un factor limitante de tasa para la formación de un estado de transición de succinimida cíclica es el tamaño de una cadena lateral del aminoácido adyacente y, por lo tanto, la glicina que tiene la cadena lateral más corta, puede conseguir la tasa de desamidación más rápida. Por otro lado, sustituyendo el grupo adyacente en el lado C terminal con un aminoácido que tenga una cadena lateral larga, la tasa de desamidación puede suprimirse. El anticuerpo B273 tiene una secuencia -N-G-(asparagina-glicina) que es susceptible a desamidación en la CDRL1 y CDRH2. Por lo tanto, los autores de la presente invención produjeron mutantes puntuales en los que el grupo adyacente se cambió de glicina a lisina, fenilalanina, leucina o ácido glutámico cada uno de los cuales tiene una cadena lateral más larga que la de la glicina. Es decir, en la CDRH2, la secuencia -N-G-(asparagina-glicina) está mutada a una secuencia -N-E-(asparagina ácido-glutámico) y en la CDRL1, la secuencia -N-G-(asparagina-glicina) está mutada a una secuencia -N-L-(asparagina-leucina), una secuencia -N-F-(asparagina-fenilalanina), una secuencia -N-K-(asparagina-lisina) o una secuencia -N-E-(asparagina-ácido glutámico), por lo cual la desamidación del anticuerpo se suprime.

Como un ejemplo de un anticuerpo que tiene las CDR anteriormente descritas, puede servir de ejemplo un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 83 y una CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84 y una región variable de cadena ligera que tiene una CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 79 en el Listado de secuencias, una CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81; un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89 y una CDRH3 que consiste en un aminoácido secuencia representada por SEQ ID NO: 84, y una región variable de cadena ligera que tiene una CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 85 en el Listado de secuencias, una CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, y una CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81; un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89 y una CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84 y una región variable de cadena ligera que tiene una CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 86 en el Listado de secuencias, una CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y una CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81; un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene la CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89 y una CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84 y una región variable de cadena ligera que tiene una CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 87 en el Listado de secuencias, una CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y una CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81; y un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89 y una CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, y una región variable de cadena ligera que tiene una CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 88 en el Listado de secuencias, una CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y una CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81.

Como un ejemplo del anticuerpo humanizado del anticuerpo B273 de ratón (incluyendo un anticuerpo modificado en la CDR), puede servir de ejemplo una combinación arbitraria de una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de

cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 70 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 66.

5 Como una combinación más preferida, puede servir de ejemplo un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 42 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 28; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 70 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 52; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 70 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 58; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 70 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 62; y un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 70 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 66.

20 Combinando una secuencia que tenga una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada descrita anteriormente con una secuencia que tenga 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. La homología es generalmente una homología de 80 % o más, preferentemente una homología de 90 % o más, más preferentemente una homología de 95 % o más, aún más preferentemente una homología de 99 % o más. Además, combinando una secuencia de aminoácidos que incluya una sustitución, delección o adición de uno a varios restos de aminoácidos 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. El número de restos de aminoácidos a sustituir, deleccionar o añadir es generalmente de 10 o menor, preferentemente de 5 a 6 o menor, más preferentemente de 2 a 3 o menor, aún más preferentemente de 1.

30 La homología entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo del programa 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) con parámetros por defecto. El algoritmo Blast también puede usarse a través de Internet mediante el acceso a la web www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Por otro lado, con el algoritmo Blast se calculan dos tipos de porcentajes de valores de identidad (o identidades) y positividad (o positivities). El primero es un valor cuando los restos de aminoácidos coinciden entre sí en dos secuencias de aminoácidos para cuyo grado de homología va a determinarse y el último es un valor obtenido considerando también los restos de aminoácidos que tienen una estructura química similar. En esta memoria descriptiva, el valor de la identidad cuando los restos de aminoácidos coinciden entre sí se usa como valor de homología.

40 Por otro lado, en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 o 70 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 141 es una región variable, y una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 142 a 471 es una región constante. Además, en la secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 28, 30, 32, 52, 58, 62 o 66 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 20 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 134 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 135 a 239 es una región constante.

50 La secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 o 70 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 o 69 en el Listado de Secuencias. En cada una de las secuencias de nucleótidos anteriores, una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena pesada del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 58 a 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 424 a 1413 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

55 La secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 28, 30, 32, 52, 58, 62 o 66 en el listado de secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 27, 29, 31, 51, 57, 61 o 65 en el Listado de Secuencias. En cada una de las secuencias de nucleótidos anteriores, una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 60 codifica la secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 61 a 402 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 403 a 717 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

Adicionalmente, el anticuerpo desvelado en el presente documento incluye un anticuerpo humano que se une al mismo epítipo que el anticuerpo B273. Un anticuerpo humano se refiere a un anticuerpo humano que solo tiene una secuencia génica de un anticuerpo procedente de un cromosoma humano. Un anticuerpo anti-DR5 humano puede obtenerse mediante un procedimiento usando un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene un fragmento cromosómico humano que contiene 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., Matsuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, págs. 722-727, etc.).

Dicho ratón productor de anticuerpos humanos puede crearse específicamente de la siguiente manera. Un animal modificado genéticamente, en el que se ha alterado el locus génico exógeno de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, y en su lugar, se ha introducido un locus génico de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana, mediante un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC, del inglés *yeast artificial chromosome*) o similar, se crea produciendo un animal genosuprimido (*knockout*) y un animal transgénico y cruzando estos animales.

Adicionalmente, de acuerdo con una técnica de modificación por ingeniería genética, usando los ADNc que codifican dicha una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano, respectivamente, y preferentemente un vector que contiene los ADNc, se transforman células eucariotas y se cultiva un transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante, mediante lo cual el anticuerpo también puede obtenerse a partir del sobrenadante de cultivo.

En este caso, como hospedador, pueden usarse, por ejemplo, células eucariotas, preferentemente células de mamífero, tales como células CHO, linfocitos o células de mieloma.

Adicionalmente, también se conoce un procedimiento de obtención de un anticuerpo humano procedente de presentación de fagos identificado 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 de fagos en el que una región variable de un anticuerpo humano se expresa en la superficie de un fago como un anticuerpo monocatenario (scFv, *single chain Fv*) y se selecciona un fago que se une a un antígeno (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), págs. 1105-1116) puede usarse.

Analizando al gen del fago seleccionado basándose en la unión con un antígeno, puede determinarse una secuencia de ADN que codifique la región variable de un anticuerpo humano que se une a un antígeno.

Si se determina la secuencia de ADN de un scFv que se une a un antígeno, puede obtenerse un anticuerpo humano preparando un vector de expresión que tenga la secuencia e introduciendo el vector en un hospedador apropiado que lo exprese (documentos 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 une el anticuerpo B273, puede determinarse que el anticuerpo humano y el anticuerpo B273 se unen al mismo epítipo. Además, confirmando que el anticuerpo humano compite con el anticuerpo B273 por la unión con DR5 (es decir, el anticuerpo humano inhibe la unión entre el anticuerpo B273 y DR5), puede determinarse que el anticuerpo humano y el anticuerpo B273 se unen al mismo epítipo incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura epitópica específica. Cuando se confirma que el anticuerpo humano y el anticuerpo B273 se unen al mismo epítipo, es de esperar contundentemente que el anticuerpo humano tenga una actividad citotóxica equivalente a la de B273.

Adicionalmente, como se muestra en el Ejemplo 4, es posible especificar un resto de aminoácido en el lado de DR5 que se encuentra adyacente a un fragmento Fab de un anticuerpo a partir de los datos de difracción de rayos X de un complejo entre el fragmento Fab y DR5. Específicamente, en el caso en el que un fragmento Fab procedente de un anticuerpo arbitrario se encuentre adyacente a un resto de glicina en la posición 26, a un resto de isoleucina en la posición 34, a un resto de ácido glutámico en la posición 36, a un resto de ácido aspártico en la posición 37, a un resto de glicina en la posición 38, a un resto de ácido aspártico en la posición 56, a un resto de leucina en la posición 57, a un resto de leucina en la posición 58, a un resto de fenilalanina en la posición 59, a un resto de leucina en la posición 61 y a un resto de arginina en la posición 62 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias, a una distancia de 4 Å o menor, puede determinarse que el anticuerpo se une al mismo epítipo que B273.

Los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos obtenidos mediante el procedimiento descrito anteriormente se evaluaron con respecto a la propiedad de unión con un antígeno mediante un procedimiento mostrado en el Ejemplo 3 o similar, y puede seleccionarse un anticuerpo preferido. Como un ejemplo de otro índice para su uso en la comparación de las propiedades de los anticuerpos, puede servir de ejemplo la estabilidad de los anticuerpos. En el Ejemplo 10 se muestra la calorimetría diferencial de barrido (DSC) que es un dispositivo con capacidad de medir rápida y exactamente una temperatura en el punto medio de desnaturalización térmica (T_m) a usar como un índice favorable de la estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Midiendo los valores T_m usando DSC y comparando los valores, puede compararse la diferencia en cuanto a la estabilidad térmica. Se sabe que la estabilidad del almacenamiento de los anticuerpos muestra alguna correlación con la estabilidad térmica de los anticuerpos (Lori Burton, y col., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, págs. 265-273) y puede seleccionarse un anticuerpo preferido usando como índice la estabilidad térmica. Los ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen los siguientes factores: el rendimiento en una célula hospedadora apropiada es alta y la agregabilidad en una solución acuosa es baja. Por ejemplo, un anticuerpo que muestra el mayor rendimiento no siempre muestra la mayor estabilidad térmica, y por lo tanto, es necesario seleccionar un anticuerpo sumamente adecuado para la administración a seres humanos haciendo una evaluación exhaustiva basándose en los índices descritos anteriormente.

Adicionalmente, también se conoce un procedimiento en el que las secuencias de cadena ligera y pesada de longitud completa de un anticuerpo se conectan usando un enlazador apropiado, mediante lo cual se obtiene una inmunoglobulina monocatenaria (Lee, H-S, y col., *Molecular Immunology* (1999) 36, págs. 61-71; Shirrmann, T. y col., *mAbs* (2010), 2, (1) pp. 1-4). Al dimerizar dicha inmunoglobulina monocatenaria, el dímero resultante puede tener una actividad y una estructura similares a las de un anticuerpo que es en sí mismo un tetrámero.

Adicionalmente, controlando la glucosilación en la que un glucano está unido al anticuerpo de la invención, es posible potenciar la actividad citotóxica dependiente de anticuerpo. Como técnica para controlar la glucosilación de anticuerpos, se conocen los documentos WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, etc. Sin embargo, no está limitada a estos documentos.

En el caso en el que un anticuerpo se produzca aislando primero un gen de anticuerpo y después introduciendo el gen en un hospedador apropiado, puede usarse una combinación de un hospedador apropiado y un vector de expresión apropiado. Ejemplos específicos del gen de anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta memoria descriptiva y un gen que codifica una secuencia de cadena ligera de la misma. Cuando una célula hospedadora se transforma, es posible insertar el gen de secuencia de cadena pesada y el gen de secuencia de cadena ligera en el mismo vector de expresión, y también en diferentes vectores de expresión por separado. En los casos en los que como hospedador se usen células eucariotas, pueden usarse células animales, células vegetales y microorganismos eucariotas. Como células animales, pueden servir de ejemplo (1) células de mamífero, por ejemplo, cepas con déficit de dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, págs. 4126-4220) de células COS de simio (Gluzman, Y., *Cell*, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (células CHO ATCC n.º CRL-1658) y células de ovario de hámster chino (CHO cells; ATCC: CCL-61). Adicionalmente, en el caso en el que se usen células procariotas, pueden ilustrarse, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Introduciendo un gen de anticuerpo diana en estas células a través de transformación y cultivando las células así transformadas *in vitro*, puede obtenerse el anticuerpo. En el procedimiento de cultivo descrito anteriormente, el rendimiento puede variar algunas veces dependiendo de la secuencia del anticuerpo, y por lo tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que se produzca fácilmente como un agente farmacéutico usando el rendimiento como un índice entre los anticuerpos que tienen actividad de unión comparable.

No hay limitación sobre el isotipo del anticuerpo de la invención, y los ejemplos de los mismos incluyen IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD e IgE, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen IgG e IgM, y adicionalmente ejemplos más preferidos de los mismos incluyen IgG1 e IgG2.

Adicionalmente, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento funcional del anticuerpo que tenga un sitio de unión antigénica del anticuerpo o un fragmento modificado del mismo. El fragmento del anticuerpo puede obtenerse tratando el anticuerpo como una proteasa, tal como papaína o pepsina, o modificando el gen de anticuerpo de acuerdo con una técnica de modificación por ingeniería genética y expresando el gen modificado en células de cultivo adecuadas. Entre estos fragmentos de anticuerpo, un anticuerpo que tenga todas o parte de las funciones de la molécula del anticuerpo de longitud completa puede recibir el nombre de fragmento funcional del anticuerpo. Como funciones del anticuerpo, pueden servir de ejemplo, en general, una actividad de unión antigénica, una actividad de neutralización de la actividad de un antígeno, una actividad de potenciación de la actividad de un antígeno, una actividad citotóxica dependiente de anticuerpo, una actividad citotóxica dependiente del complemento y una actividad citotóxica celular dependiente del complemento. La función del fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la invención es la actividad de unión a DR5, preferentemente la actividad de inducción de la apoptosis en células, más preferentemente la actividad citotóxica a través de la inducción de la apoptosis en células cancerosas. Sin embargo, el anticuerpo de la invención puede tener actividad citotóxica dependiente de anticuerpo, actividad citotóxica dependiente de complemento y/o actividad citotóxica celular dependiente de complemento así como actividad de inducción de la apoptosis en células.

Los ejemplos del fragmento del anticuerpo incluyen Fab, F(ab')₂, Fv, Fv monocatenario (scFv) en el que las moléculas de Fv de la cadena pesada y de la cadena ligera están conectadas mediante un enlazador apropiado, un diacuerpo (diacuerpos), un anticuerpo lineal y un anticuerpo poliespecífico compuesto del fragmento de anticuerpo. Adicionalmente, el fragmento Fab', que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo
5 obtenido tratando F(ab')₂ en condiciones reductoras, también se incluye en el fragmento del anticuerpo.

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

10 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')₂). El anticuerpo biespecífico puede producirse conectando las cadenas pesada y ligera (pares 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., *Naturaleza* (1983) 305, págs. 537-539).

15 El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monocatenario (también denominado scFv). El anticuerpo monocatenario puede obtenerse conectando la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo mediante 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 mediante
20 un enlazador polipeptídico también puede usarse como anticuerpo biespecífico.

En este campo técnico se conoce un procedimiento de producción de 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 mediante un enlazador polipeptídico (Huston, J. S. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988), 85, págs. 5879-5883). En el scFv, la región variable de cadena pesada y la región variable de
25 cadena ligera pueden proceder del mismo anticuerpo o de anticuerpos diferentes.

Como enlazador polipeptídico a usar para conectar las regiones variables, se usa un péptido monocatenario determinado compuesto de 12 a 19 restos, por ejemplo.

30 El ADN que codifica un scFv puede obtenerse realizando amplificación usando, como molde, un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos completa o una secuencia de aminoácidos parcial deseada de un ADN seleccionado de un ADN que codifica la cadena pesada o la región variable de cadena pesada del anticuerpo descrito anteriormente y un ADN que codifica la cadena ligera o la región variable de cadena ligera del mismo, mediante un procedimiento de PCR usando un par de cebadores que define ambos extremos del mismo, y adicionalmente realizando
35 amplificación combinando un ADN que codifica una parte del enlazador polipeptídico y un par de cebadores que define ambos extremos del mismo para poner en contacto los dos extremos con la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente.

Adicionalmente, una vez que se produce el ADN que codifica un scFv, puede obtenerse un vector de expresión que contenga el mismo y un hospedador transformado por el vector de expresión de acuerdo con un procedimiento habitual. Adicionalmente, usando el hospedador resultante, el scFv puede obtenerse de acuerdo con un
40 procedimiento habitual. Un fragmento de anticuerpo del mismo puede producirse en un hospedador obteniendo un gen y expresando el gen de la misma manera que la descrita anteriormente.

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 una pluralidad de anticuerpos que reconoce una pluralidad de epítopos del mismo antígeno. Como un procedimiento de multimerización del anticuerpo, puede servir de ejemplo la
45 unión del dominio CH3 de IgG con dos moléculas scFv, la unión con estreptavidina y la introducción de un motivo hélice-giro-hélice.

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo policlonal que es una mezcla de varios tipos de anticuerpos anti-DR5 que tienen secuencias de aminoácidos diferentes. Como un ejemplo del anticuerpo policlonal, puede ilustrarse una mezcla de tipos varios de anticuerpos que tienen diferentes CDR. Como tal anticuerpo policlonal,
50 pueden usarse anticuerpos obtenidos cultivando una mezcla de células que produce diferentes anticuerpos y después purificando los anticuerpos del cultivo resultante (véase el documento WO 2004/061104).

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

Adicionalmente, el anticuerpo de la invención puede estar en forma de un conjugado formado entre cualquiera de estos anticuerpos y otro agente medicinal (inmunoconjugado). Los ejemplos de dicho anticuerpo incluyen uno en el que el anticuerpo está conjugado con un material radiactivo o un compuesto que tenga una acción farmacológica
55 (*Nature Biotechnology* (2005) 23, págs. 1137-1146).

El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta la homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo pueden realizarse empleando un procedimiento convencional de purificación y separación de proteínas. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse seleccionando y combinando apropiadamente cromatografía en columna, filtración con filtro, ultrafiltración, precipitación salina, diálisis, electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, electroforesis e isoelectroenfoque (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 and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero los procedimientos no están limitados a estos.

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.

Como una columna a usar en cromatografía de afinidad, puede servir de ejemplo una columna de proteína A y una columna de proteína G.

Por ejemplo, como una columna que usa una columna de Proteína A, puede ilustrarse, Hiper D, POROS y Sepharose FF (Farmacia). Adicionalmente, usando un vehículo que tenga un antígeno inmovilizado en el mismo, el anticuerpo también puede purificarse utilizando la propiedad de unión del anticuerpo con el antígeno.

(4) Ejemplos específicos de otros anticuerpos anti-DR5

Anticuerpos anti-DR5 que inducen la apoptosis en células que expresan DR5 se describen, por ejemplo, en los documentos WO 98/51793, WO 2001/83560, WO 2002/94880, WO 2003/54216, WO 2006/83971 y WO 2007/22157. Adicionalmente, los anticuerpos anti-DR5 denominados tigatuzumab (CS-1008), lexatumumab (HGS-ETR2), HGS-TR2J, drozitumab (APOMAB), conatumumab (AMG-655) y LBY135 aún se encuentran en ensayos clínicos o estuvieron en ensayos clínicos en el pasado. Los anticuerpos anti-DR5 que aún continúan en ensayos clínicos hasta la fecha en la que se presentó esta solicitud son tigatuzumab, lexatumumab, y conatumumab. Los nuevos anticuerpos anti-DR5 descritos en la presente memoria descriptiva tienen una actividad antitumoral superior *in vitro* y/o *in vivo* en comparación con tigatuzumab, lexatumumab, conatumumab y drozitumab, anteriormente descritos.

3. Compuestos farmacéuticos que contienen anticuerpos anti-DR5

Los anticuerpos obtenidos mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior "2. Producción de anticuerpos monoclonales anti-DR5" pueden usarse como un agente farmacéutico, particularmente un agente terapéutico y/o preventivo para el cáncer dado que cada uno de los anticuerpos actúa *in vivo* como un agonista para un receptor relacionado con la apoptosis, DR5, e induce la apoptosis en células cancerosas mediante el receptor para exhibir una actividad citotóxica.

La actividad citocida exhibida por un anticuerpo *in vitro* puede determinarse midiendo su actividad inhibiendo la proliferación de células que sobreexpresan un receptor relacionado con la apoptosis.

Por ejemplo, se cultiva una línea de células de cáncer que sobreexpresa DR5, se añade un anticuerpo al sistema de cultivo a diferentes concentraciones, y puede medirse la actividad inhibidora contra la formación de focos, formación de colonias y proliferación de esferoides.

El efecto terapéutico *in vivo* de un anticuerpo sobre el cáncer usando animales experimentales puede determinarse, por ejemplo, midiendo un cambio en las células cancerosas administrando el anticuerpo a ratones desnudos a los que se les implanta una línea celular tumoral que sobreexpresa DR5.

Los ejemplos del tipo de cáncer incluyen cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de útero, melanoma, glioblastoma y cáncer de células sanguíneas (tal como leucemia y linfoma), sin embargo, el tipo de cáncer no está limitado a estos siempre que la célula cancerosa a tratar exprese DR5.

Adicionalmente, se sabe que un anticuerpo contra DR5 induce apoptosis en células inflamatorias (J. Clin. Invest. 1996, 98 (2), 271-278; Int. Immunol. 1996, 8 (10), 1595-1602). Por lo tanto, el anticuerpo de la invención y los anticuerpos como los desvelados en el presente documento también pueden usarse como un agente terapéutico para una respuesta autoinmunitaria o una respuesta inflamatoria. Los ejemplos de la enfermedad autoinmunitaria o enfermedad inflamatoria incluyen lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de Sjogren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmunitaria, esterilidad, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, púrpura trombocitopénica, diabetes mellitus insulino dependiente, alergia, asma, una enfermedad atópica, arterioesclerosis, miocarditis, cardiomiopatía, glomerulonefritis, anemia aplásica, y rechazo después de trasplante de órgano.

Una sustancia a usar en una preparación aceptable en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es preferentemente no tóxica para una persona a la cual va a administrarse la composición farmacéutica en términos de dosis y concentración.

5 La composición farmacéutica de la invención puede contener una sustancia para uso farmacéutico que tenga la capacidad de cambiar o mantener el pH, la presión osmótica, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, condición aséptica, estabilidad, solubilidad, tasa de liberación, tasa de absorción y permeabilidad de la misma. Los ejemplos de dicha sustancia para uso farmacéutico incluyen, pero sin limitación, aminoácidos, tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, arginina y lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico, sulfato sódico y hidrogenosulfito sódico; tampones, tales como tampones de fosfato, citrato, borato, hidrogeno carbonato sódico, y soluciones de Tris-HCl; cargas, tales como, manitol y glicina; agentes quelantes, tales como, tetra acetato de etilendiamina (EDTA); agentes formadores de complejos, tales como, cafeína, polivinilpirrolidona, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina; expansores tales como glucosa, manosa y dextrina; otros hidratos de carbono, tales como, monosacáridos y disacáridos; agentes colorantes; esencias; diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; conservantes, tales como polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, 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, polisorbato, incluyendo polisorbato 20 y polisorbato 80, Tritón, trometamina, lecitina y colesterol; agentes potenciadores de la estabilidad tales como sacarosa y sorbitol; 10 agentes potenciadores de la elasticidad tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio y manitol y sorbitol; agentes transportadores; excipientes; y/o adyuvantes farmacéuticos. La cantidad de estas sustancias para uso farmacéutico es preferentemente de 0,01 a 100 veces, en particular, preferentemente de 0,1 a 10 veces el peso del anticuerpo anti-DR5. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente una formulación preferida de la composición farmacéutica en una preparación dependiendo de la enfermedad a la que cual se aplique la composición, la vía de administración a aplicar o similar.

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 normalmente usada para administración parenteral. Además, como vehículo también puede usarse una solución salina fisiológica neutra o una solución salina fisiológica que contenga albúmina de suero. La composición farmacéutica puede contener un tampón Tris de pH 7,0 a 8,5, un tampón acetato de pH 4,0 a 5,5 o un tampón citrato de pH 3,0 a 6,2. Adicionalmente, dicho tampón puede complementarse con sorbitol u otro compuesto.

Los ejemplos de la composición farmacéutica de la invención incluyen una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DR5 o una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DR5 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 tenga una composición seleccionada y una pureza requerida. La composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DR5 y la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DR5 y al menos un agente terapéutico para el cáncer también puede 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-DR5, puede administrarse simultáneamente, independientemente de, o secuencialmente con el anticuerpo anti-DR5, o el agente terapéutico y el anticuerpo anti-DR5 pueden administrarse a intervalos de dosificaciones diferentes. Los ejemplos de dicho agente terapéutico para el cáncer incluyen abraxano, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, irinotecán (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina, 5-FU, y los agentes medicinales descritos en el documento WO 2003/038043, sin embargo, el agente no está limitado a estos siempre que el agente sea un agente medicinal que tenga una actividad antitumoral.

La composición farmacéutica de la invención puede prepararse para administración parenteral o para absorción gastrointestinal a través de administración oral. La composición y concentración de una preparación puede determinarse dependiendo del procedimiento de administración. Cuanto mayor sea la afinidad por DR5 del anticuerpo anti-DR5 contenido en la composición farmacéutica de la invención, es decir, menor su constante de disociación (valor K_d) por DR5, más puede exhibir el anticuerpo anti-DR5 su eficacia farmacológica incluso cuando disminuya 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 hecho. Al igual que para la dosis, en el caso en el que un anticuerpo anti-DR5 humano se administre a seres humanos, el anticuerpo puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg una vez de uno a 180 días.

Los ejemplos de la forma de dosificación de la composición farmacéutica de la invención incluyen inyecciones, 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 se limita a los mismos. Obsérvese que las respectivas operaciones en relación con la manipulación genética en los siguientes ejemplos se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en "Molecular Cloning" (escrito por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., publicado por Cold Spring

Harbor Laboratory Press in 1989) o en el caso del uso de reactivos o kits disponibles en el comercio, estos se usan de acuerdo con los protocolos adjuntos al mismo a menos que se indique lo contrario.

[Ejemplo 1] Producción de anticuerpo B273 de ratón

1) -1 Producción de la proteína DR5 humana (proteína de fusión dominio extracelular de DR5 humano/Fc humano)

5 1) -1-1 Producción del vector de expresión del dominio extracelular de DR5 humano

Se construyó un vector que expresaba la proteína DR5 humana (isoforma 2: NP_671716) insertando un gen, en el que se fusionó el dominio extracelular de DR5 humano con una región de IgG1/Fc humana, aguas abajo del promotor de CMV (citomegalovirus).

1) -1-2 Producción de la proteína DR5 humana

10 La introducción del vector de expresión en células 293 FreeStyle y la recogida del sobrenadante de cultivo la realizó Invitrogen Corporation (actualmente Life Technologies Japón Ltd.).

1) -1-3 Purificación de la proteína DR5 humana

15 El sobrenadante de cultivo obtenido en el apartado b) anterior se purificó usando cromatografía de columna de afinidad con Proteína A. Se aplicaron 5 l del sobrenadante de cultivo a "HiTrap Protein AFF" (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., Cat. n.º 17-5079-01) equilibrada con PBS, seguido de lavado con PBS. Posteriormente, se añadió una solución de arginina 2 M (pH 4,0) a la columna y se recogió una fracción que contenía la proteína DR5 humana. La fracción se añadió a un dispositivo de filtro de centrifuga (Amicon Ultra-4, peso molecular fraccional: 10 K, Millipore Co., Ltd.) y se realizaron un reemplazo de líquido con PBS y una condensación. El volumen final se constituyó hasta 6 ml, que se usó como una muestra purificada (rDR5-hFc). La determinación cuantitativa del producto de proteína purificado se realizó usando el "Kit de Ensayo de Proteínas Micro BCA" (PIERCE N.º 23235). Como un patrón de referencia, se usó el "patrón de albúmina" contenido en el kit.

20

1) -2 Inmunización

25 Se usaron ratones BALB/cAJcl (CLEA Japón, Inc.) de 5 a 6 semanas de vida. El día 0, se administró, por vía subcutánea, una mezcla de 50 µg de rDR5-hFc, preparada en el apartado 1) -1-3, y adyuvante completo de Freund (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (a una proporción de volumen de 1:1) cerca del pescuezo de cada ratón. Los días 14 y 28, se administró, por vía subcutánea, una mezcla de 50 µg de rDR5-hFc y adyuvante incompleto de Freund (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (a una proporción de volumen de 1:1) en la región dorsal de cada ratón. El día 42, se administraron 50 µg de rDR5-hFc en la cavidad abdominal de cada ratón y el día 45, se extirpó el bazo de cada ratón y se usó para la producción de hibridomas.

30 1) -3 Producción de hibridomas

Esplenocitos y células P3X63Ag8U.1 de mieloma de ratón se sometieron a fusión celular usando PEG 4000 (fabricado por Immunobiological Laboratories Co., Ltd.) y las células fusionadas resultantes se diluyeron con Medio de Selección D de ClonaCell-HY (fabricado por StemCell Technologies, Inc., n.º 03804) y se cultivaron. Después, se recogieron las colonias de hibridoma formadas, mediante las cuales se produjeron hibridomas monoclonales. Las colonias de hibridoma recogidas se cultivaron por separado y, usando el sobrenadante de cultivo obtenido de cada hibridoma, se identificó un hibridoma productor de anticuerpos anti-DR5.

35

1) -4 Identificación de anticuerpos por el procedimiento de ELISA celular

1) -4-1 Construcción del vector de expresión mutante DR5 humano (pcDNA3.1-DR5M)

40 Un cDNA que codifica la proteína DR5 humana (isoforma 2: NP_671716) se clonó en un vector pcDNA3.1(+) y se construyó un vector de expresión modificado con dominio de muerte pcDNA3.1-DR5M que se diseñó para expresar una proteína en la que el aminoácido L en la posición 334 en el dominio de muerte estaba sustituido por D.

1) -4-2 Preparación de células que expresan el gen antigénico

45 Se prepararon células HEK 293 a $7,5 \times 10^5$ células/ml en medio DMEM que contenía FBS al 10 %. Después, células HEK 293 se transfectaron con el vector de expresión de DR5 modificado con dominio de muerte pcDNA3.1-DR5M o pcDNA3.1-simulado que servía como un control, usando Lipofectamine 2000 (fabricado por Life Technologies Ltd. Japón) y cada suspensión celular se dispensó a 50 µl/pocillo en una microplaca de tamaño medio de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated). Las células se cultivaron durante una noche en medio DMEM que contenía FBS al 10 % en condiciones de temperatura de 37 °C y con CO₂ al 5 %. Las células transfectadas así obtenidas en un estado adherente se usaron como tales en un ELISA celular.

50

1) -4-3 ELISA celular

Después de retirar el sobrenadante del cultivo de las células HEK 293 transfectadas con el vector de expresión preparado en el apartado 1) -4-2, el sobrenadante de cultivo de hibridoma se añadió a cada una de las células HEK 293 transfectadas con pcDNA3.1-DR5M y a las células HEK 293 transfectadas con pcDNA3.1-simulado, y la placa se dejó reposar a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar las células de cada pocillo una vez con PBS que contenía FBS al 5 %, a cada pocillo se le añadió anti-IgG de ratón de cabra, conjugado con peroxidasa (fabricado por Chemicon Co., Ltd., n.º AP181P) diluido a 500 veces con PBS que contenía FBS al 5 %, y la placa se dejó reposar a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar las células de cada pocillo 5 veces con PBS que contenía FBS al 5 %, una solución reveladora de color OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y H₂O₂ se disolvieron a 0,4 mg/ml y al 0,6 % (v/v), respectivamente, en una solución para disolver OPD (cittrato trisódico 0,05 M y dodecahidrato fosfato de hidrógeno disódico 0,1 M pH 4,5) se añadió a 25 µl/pocillo. Se dejó proseguir una reacción de revelado de color mientras algunas veces se agitaba la mezcla de reacción, y la reacción de revelado de color se detuvo añadiendo HCl 1 M a 25 µl/pocillo. Después de esto, se midió una absorbancia a 490 nm usando el lector de placa (ARVO, fabricado por Perkin Elmer, Inc.). Para seleccionar un hibridoma que produjese un anticuerpo que se uniese específicamente a DR5 expresado en la membrana celular, se seleccionó un hibridoma que producía un sobrenadante de cultivo que, en comparación con las células HEK293 transfectadas con el pcDNA3.1-simulado (control), mostraba una mayor absorbancia en las células HEK 293 transfectadas con el vector de expresión pcDNA3.1-DR5M, que era positivo para la producción de un anticuerpo anti-DR5

1) -5 Identificación del anticuerpo por el procedimiento de citometría de flujo

1) -5-1 Preparación de células que expresan el gen antigénico

Se sembraron células 293T a 5 x 10⁴ células/cm² en un matraz de 225 cm² (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) y se cultivaron durante una noche en medio DMEM que contenía FBS al 10 % en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Al siguiente día, las células 293T se transfectaron con pcDNA3.1-DR5M o pcDNA3.1-simulado que sirve como un control usando Lipofectamine 2000 y cultivado adicionalmente durante una noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Al día siguiente, las células 293T transfectadas con el vector de expresión se trataron con TrypLE Express (fabricado por Life Technologies Japón Ltd.). Después, las células se lavaron con DMEM que contenía FBS al 10 %, y después de esto se suspendieron en PBS que contenía FBS al 5 %. La suspensión celular así obtenida se usó en un análisis de citometría de flujo.

1) -5-2 Análisis de citometría de flujo

La suspensión celular 293T preparada en 1) -5-1 se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Después, el sobrenadante de cultivo de hibridoma se añadió a cada una de las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-DR5M y las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-simulado para suspender las células, y las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Después las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5 %, una fracción de IgG de cabra conjugada con fluoresceína contra IgG de ratón (molécula entera) (fabricada por Cappel Co., Ltd., n.º 55493) diluida 1.000 veces con PBS que contenía FBS al 5 % se añadió al mismo para suspender las células, y las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Después las células se lavaron 3 veces con PBS que contenía FBS al 5 %, las células se resuspendieron en PBS que contenía FBS al 5 % complementado con 7-aminoactinomicina D 2 µg/ml (fabricado por Invitrogen (Molecular Probes) Corporation) y la detección se realizó usando un flujocitómetro (FC500, Beckman Coulter, Inc.). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). Las células muertas positivas a 7-aminoactinomicina D se excluyeron usando una selección. Después, se crearon histogramas de intensidad de fluorescencia FITC de células viables. Un hibridoma que produce una muestra que da una mayor intensidad de fluorescencia en el histograma de intensidad de fluorescencia de las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-DR5M en comparación con el histograma de intensidad de fluorescencia de las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-simulado que sirve como control se seleccionaron para ser positivas para la producción de un anticuerpo anti-DR5.

1) -6 Exploración en términos de efecto citocida

Usando los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas seleccionados que eran positivos para la producción de un anticuerpo anti-DR5 en 1) -4 y 1) -5, se confirmó un efecto inductor de muerte celular en la línea celular Jurkat de linfocito T humano. El anti IgG Fc de ratón de cabra AffiniPure específico (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 115-005-071) preparado a 50 µg/ml con Tris-HCl 5 mM (pH 8,5) se dispensó a 25 µl/pocillo en una microplaca de media área de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated) y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después cada pocillo se lavó dos veces con PBS, se añadió un sobrenadante de cultivo de hibridoma a cada pocillo y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después cada pocillo se lavó dos veces con PBS, se prepararon células Jurkat a 4,0 x 10⁴ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % se añadieron a 25 µl/pocillo y se cultivaron en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 20 horas. El efecto citocida del anticuerpo monoclonal anti-DR5 presente en el sobrenadante del cultivo de hibridoma se evaluó mediante determinación cuantitativa de la cantidad de ATP procedente de células viables usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571). Como resultado, se establecieron hibridomas que producían 5 tipos de anticuerpos monoclonales (B086, B139, B192, B273 y B467),

cada uno de ellos mostraron una disminución en la cantidad de ATP al 80 % o más en comparación con el caso de añadir el medio para cultivar el hibridoma.

1) -7 Determinación de isotipo del anticuerpo monoclonal

5 Los isotipos de los anticuerpos monoclonales se determinaron usando el kit de isotipificado monoclonal de ratón (fabricado por Abd Serotec, Inc.). Como resultado, se confirmó el isotipo de B086, B139, B192, B273, B467 que era la cadena κ de IgG1.

1) -8 Preparación del anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal se purificó de la ascitis de un ratón al que se implantó un hibridoma (en el presente documento en lo sucesivo denominado "material de partida para la purificación del anticuerpo").

10 La ascitis de ratón se preparó de la siguiente manera. En primer lugar, ratones BALB/cAJcl-nu/nu (Japón SLC, Inc.) de 7 a 8 semanas de vida se trataron con pristano (fabricado por Sigma Co., Ltd.) y después de aproximadamente 3 semanas, se implantó un hibridoma lavado con solución salina fisiológica, en la cavidad abdominal a 1×10^7 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 malla de $0,22 \mu\text{m}$ y el material resultante se usó como material de partida para la purificación del anticuerpo.

15 El anticuerpo se purificó mediante Hitrap MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.). Es decir, el material de partida para la purificación del anticuerpo se añadió a una columna, y la columna se lavó con PBS, y después de eso, se realizó la elución con clorhidrato de arginina 2 M, pH 4,0. Después de neutralizar la solución de anticuerpo eluida, el tampón se reemplazó con PBS. La concentración del anticuerpo se obtuvo eluyendo el anticuerpo unido a una Columna PEEK POROS G de $20 \mu\text{m}$, $4,6 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, $0,83 \text{ ml}$ (Applied Biosystems, Inc.) y se midió la absorbancia (D.O. 280 nm) del eluato. Específicamente, se añadió una muestra de anticuerpo diluida con PBS a POROS G $20 \mu\text{m}$ equilibrada con un tampón de equilibrio (dodecahidrato de dihidrogeno fosfato sódico 30,6 mM, fosfato monopotásico 19,5 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0). Después, la columna se lavó con el tampón de equilibrio, y el anticuerpo unido a la columna se eluyó después con un eluyente (HCl 0,1 % (v/v), NaCl 0,15 M). El área pico de la absorbancia (DO 280 nm) del eluato se midió y la concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: concentración de la muestra de anticuerpo (mg/ml) = (área pico de la muestra de anticuerpo)/(área pico del patrón de referencia (IgG1 humana) x concentración del patrón de referencia (mg/ml) x factor de dilución de la muestra. Además, la concentración de la endotoxina contenida en el anticuerpo obtenido se midió usando el Ensayo Limulus ES-II Single de Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 295-51030 que contenía endotoxina patrón de control) y un toxímetro (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., ET-301 o ET-5000) y se confirmó que era de 1 UE/mg o menor. El anticuerpo resultante se usó en el experimento posterior.

1) -9 actividad citocida *in vitro* del anticuerpo B273 de ratón contra líneas celulares de cáncer humano

35 Cada una de una línea celular Jurkat de linfoma T humano y una línea celular de glioblastoma humano U-87MG se preparó a $4,4 \times 10^4$ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % o medio MEM (medio esencial mínimo) que contenía FBS al 10 % y se añadió a una microplaca de 96 pocillos blancos de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated) a $45 \mu\text{l}$ /pocillo, y se cultivó durante una noche en las condiciones de temperatura a 37°C y con CO_2 al 5 %. El anticuerpo B273 de ratón o el anticuerpo IgG1 de ratón (fabricado por R y D Systems, Inc.) se mezcló con la misma concentración de anti Fc de IgG de ratón de cabra AffiniPure específico (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 115-005-071) y la mezcla resultante se añadió a 5 μl /pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo B273 de ratón o del anticuerpo IgG1 de ratón fuese de 10.000 a 0,01 ng/ml y las células se cultivaron en condiciones de 37° y CO_2 al 5 % durante 24 horas. La cantidad de ATP procedente de células viables en cada pocillo se midió con un luminómetro (fabricado por Perkin Elmer, Inc.) usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571) de acuerdo con el protocolo adjunto. La actividad citocida se evaluó tomando el valor obtenido del pocillo, al cual se añadió el medio, en lugar de la solución de anticuerpo como 100 % (Figura 1). En cada gráfico, la viabilidad celular se expresó como una media \pm desviación típica ($n = 3$). Como resultado, se descubrió que el anticuerpo B273 de ratón exhibía un efecto citocida en ambas líneas celulares de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo.

[Ejemplo 2] Clonación del gen del anticuerpo B273 de ratón y producción del gen del anticuerpo quimérico humano

50 2) -1 Clonación del ADNc del anticuerpo B273 de ratón y determinación de secuencia

2) -1-1 Determinación de las secuencias de aminoácidos N-terminal de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo B273 de ratón

55 Para determinar las secuencias de aminoácidos N terminal de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo B273 de ratón, el anticuerpo B273 de ratón purificado en el Ejemplo 1-8 se separó por SDS-PAGE. La proteína en el gel se transfirió desde el 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 borato sódico 10

mM pH 8,0) y después de esto se tiñó sumergiéndolo en una solución colorante (metanol al 50 %, ácido acético al 20 % y azul brillante de Coomassie al 0,05 %) durante 5 minutos, seguido de eliminación de la tinción con metanol al 90 %. Las partes de la banda correspondientes 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 y se realizó un intento para identificar sus secuencias de aminoácidos N terminal respectivas mediante un procedimiento Edman automático (véase Edman y col. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80) usando Procise (marca registrada) Modelo 492cLC Secuenciador de Proteína cLC (Applied Biosystems, Inc.). Como resultado, la secuencia de aminoácidos N terminal de la banda correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón fue EVQLQQSGPELVKPG (SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias) y la secuencia de aminoácidos N terminal de la banda correspondiente a la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón fue DVVMTQTPLSLPVSLGDQAS (SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias).

2) -1-2 Preparación de ARNm del hibridoma productor del anticuerpo B273 de ratón

Para clonar los ADNc que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón, respectivamente, se preparó ARNm del hibridoma productor del anticuerpo B273 de ratón usando el Kit de Purificación de ARNm Quick Prep (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Limitado.).

2) -1-3 Clonación del ADNc del anticuerpo B273 de ratón y determinación de secuencias

Con referencia a los hallazgos de que los isotipos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo B273 de ratón eran los $\gamma 1$ y κ encontrados en el Ejemplo 1-7, y a las secuencias de aminoácidos N terminal de las cadenas pesada y ligera determinadas en el apartado 2) -1-1 anterior, y a la base de datos de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos preparadas por Kabat y col. (véase Kabat, EA y col., (1991), in Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. I and II, U.S. Department of Health and Human Services), se sintetizaron diversos cebadores oligonucleotídicos que hibridaban con la región 5' terminal de una región que codificaba el gen del anticuerpo y la región 3' terminal del mismo que contenía un codón de terminación, respectivamente, y se amplificó un ADNc que codificaba la cadena pesada y un ADNc que codificaba la cadena ligera usando el ARNm preparado en el apartado 2) -1-2 y el Kit para PCR de ARN de una etapa TaKaRa (AMV) (TaKaRa Bio, Inc.). Como resultado, el ADNc que codificaba la cadena pesada del anticuerpo y el ADNc que codificaba la cadena ligera del anticuerpo pudieron amplificarse mediante los siguientes conjuntos de cebadores.

Un conjunto de cebadores para la cadena pesada

5'-aagaattcatggatggagctgtatc-3' (MH258E1F1: SEQ ID NO: 3 en el Listado de Secuencias)
5'-aagatatttaccaggagagtgaggag-3' (G1EVR1: SEQ ID NO: 4 en el Listado de Secuencias)

Un conjunto de cebadores para cadena ligera

5'-aagaattcatgaagtgctgttagg-3' (MK19EIF1: SEQ ID NO: 5 en el Listado de Secuencias)
5'-aagatatttaacactcattcgttgaagct-3' (KEVR1: SEQ ID NO: 6 en el Listado de Secuencias)

Cada uno de los ADNc que codificaba la cadena pesada y el ADNc que codificaba la cadena ligera amplificado 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 de la cadena ligera clonada se determinó usando un analizador de secuencias de genes ("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.).

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón se representa por SEQ ID NO: 7 en el Listado de Secuencias y su secuencia de aminoácidos se representa por SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón se representa por SEQ ID NO: 9 en el Listado de Secuencias y su secuencia de aminoácidos se representa por SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 7 y 8 se muestran en la Figura 28, y las secuencias de las SEQ ID NO: 9 y 10 se muestran en la Figura 29.

Adicionalmente, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y de la cadena ligera se analizaron por 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 B273 de ratón, la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 8 en el Listado de Secuencias es una región variable. También se descubrió que en la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón, la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 133 de SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias es una región variable.

2) -2 Producción del vector de expresión del anticuerpo B273 quimérico

2) -2-1 Producción de vectores de expresión universales pEF6KCL y pEF1FCCU

2) -2-1-1 Construcción del vector de expresión pEF6KCL de cadena ligera quimérica y humanizada

Realizando PCR, usando como molde el plásmido pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) y también usando los siguientes cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN desde inmediatamente aguas abajo de BGHpA (Posición de Secuencia: 2174) hacia Smal (Posición de Secuencia: 2958) (un fragmento de ADN que contiene el origen de replicación f1 y el promotor y origen de SV40, en lo sucesivo en el presente documento denominado "fragmento A").

- 5 5'-ccacgcgccctgtagcggcgccattaagc-3' (cebador EFF1: SEQ ID NO: 11 en el Listado de Secuencias)
 5'-aaaccgggagcttttgcaaaagcctagg-3' (cebador EFsmaR: SEQ ID NO: 12 en el Listado de Secuencias)

El fragmento A obtenido y un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 13, en lo sucesivo en el presente documento denominado "fragmento B") que contiene una secuencia de ADN que codifica una señal secretora de cadena κ humana, una región constante de cadena κ humana y una señal adicional poli A humana se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante. El fragmento de ADN así obtenido, en el que el fragmento A y el fragmento B se ligaron entre sí, se sometió a digestión con las enzimas de restricción KpnI y Smal, que se ligó con el plásmido pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) que se sometió a digestión con las enzimas de restricción KpnI y Smal, mediante lo cual se construyó un vector de expresión pEF6KCL de cadena ligera quimérica y humanizada que tenía una secuencia de señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena κ humana y una secuencia señal adicional poli A humana aguas abajo del promotor EF1.

2) -2-1-2 Construcción de pEF1/KCL

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

20 2) -2-1-3 Construcción del vector de expresión pEF1FCCU de cadena pesada quimérica y humanizada

Un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 14) que contiene una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de una secuencia señal y una región constante de IgG1 humana se sometió a digestión con las enzimas de restricción NheI y PmeI y se ligó con el plásmido pEF1KCL que se sometió a digestión con NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión pEF1FCCU de cadena pesada quimérica y humanizada que tenía una secuencia señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena pesada humana y una secuencia señal adicional poli A humana aguas abajo del promotor EF1.

2) -2-2 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo quimera de B273

Usando como molde el ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón y también usando KOD-Plus-(TOYOBO, Co., Ltd.) y el siguiente conjunto de cebadores, se amplificó una región que contenía el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el producto amplificado con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo quimérico y humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo quimera de B273. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/B273L". La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo quimera de B273 se representa por SEQ ID NO: 15 en el Listado de Secuencias y su secuencia de aminoácidos de se representa por SEQ ID NO: 16. Las secuencias de las SEQ ID NO: 15 y 16 se muestran en la Figura 30. Por otro lado, el resto de aminoácido en la posición 134 en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo quimera representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias se localiza en el extremo carboxilo de la región variable de cadena ligera y corresponde al resto de alanina en la posición 133 en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón representada por SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias, sin embargo, en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16, el resto ya se ha sustituido con un resto de treonina procedente de una cadena ligera del anticuerpo humano.

Conjunto de cebadores para la cadena ligera:

- 45 5'-aaacatagcggatgtgtgatgacccaaactccactctcc-3' (B273LF: SEQ ID NO: 17 en el Listado de Secuencias)
 5'-aaacgtacgtttgattccagctgtgtgcctccaccgaacg-3' (B273LR: SEQ ID NO: 18 en el Listado de Secuencias)

2) -2-3 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de tipo quimera de B273

Usando como el ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón y también usando KOD-Plus-(TOYOBO, Co., Ltd.) y el siguiente conjunto de cebadores, se amplificó una región que contenía el ADNc que codifica la región variable de cadena pesada. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el producto amplificado con la enzima de restricción BlnI se insertó en el vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo quimérico y humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena pesada de tipo quimera de B273. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF1FCCU/B273H". La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo quimera de B273 se representa por SEQ ID NO: 19 en el Listado de Secuencias y su secuencia de aminoácidos se representa por SEQ ID NO: 20. Las secuencias de las SEQ ID NO: 19 y 20 se muestran en la Figura 31.

Conjunto de cebadores para la cadena pesada:

5'-aaagctgagcggaggttcagctgcagcagctggacctgagc-3' (B273HF: SEC ID N°: 21 en el Listado de Secuencias)
 5'-aaagctgagctgactgtgagagtggcctggccccagtag-3' (B273HR: SEC ID N°: 22 en el Listado de Secuencias)

2) -3 Preparación del anticuerpo quimérico B273

2) -3-1 Producción del anticuerpo quimérico B273

5 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 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora agitando a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilenimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, pEF1FCCU/B273H (0,4 mg) y pEF6KCL/B273L (0,8 mg) preparados con el Kit para plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de polietilenimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F y el cultivo se realizó agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ 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 B273 quimérico obtenido por una combinación de pEF1FCCU/B273H y pEF6KCL/B273L se denominó "cB273".

2) -3-2 Purificación de cB273

20 El sobrenadante de cultivo obtenido en el apartado 2) -3-1 anterior se purificó mediante un proceso de dos etapas que incluía cromatografía de afinidad de rProteína A (a una temperatura de 4 a 6 °C) e hidroxapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación mediante hidroxapatita de cerámica a temperatura ambiente. En primer lugar, 1100 a 1200 ml del sobrenadante de cultivo se aplicaron 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 verter toda la solución del cultivo en la columna, esta se lavó con 15 a 30 ml de PBS. Posteriormente, la elución se realizó con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0) y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el tampón se reemplazó por un tampón que contenía fosfato sódico 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH de 6,5. Posteriormente, la solución del anticuerpo sometida al reemplazo del tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita de 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. Después, se realizó una elución en gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el líquido se reemplazó por CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0). Finalmente la solución resultante se concentró usando un Dispositivo de filtro Centrifugal UF 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 así obtenida se usó como una muestra purificada.

40 [Ejemplo 3] Medición de la actividad del anticuerpo quimérico humano B273 (cB273) (*in vitro*)

3) -1 Estudio de la propiedad de unión selectiva del anticuerpo cB273 con el dominio extracelular de DR5 humano

La propiedad de unión de cB273 con proteínas de dominio extracelular de TRAIL R1 a R4 humano y TRAIL R2 de ratón (fabricado por R y D Systems, Inc.) se estudió mediante un procedimiento de ELISA directo descrito más adelante. En primer lugar, cada una de las proteínas de dominio extracelular de TRAIL Rs se diluyó a 1 µg/ml con PBS y la solución diluida se dispensó a 50 µl/pocillo en una inmunoplaaca (fabricada por Nunc, Inc., n.º 442404) y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C, mediante lo cual la proteína se adsorbió a la placa. Al día siguiente, el líquido de cada pocillo se retiró y cada pocillo se lavó una vez con PBS. Después de esto, para suprimir la adsorción no específica de las proteínas, se dispensó PBS que contenía suero bovino fetal al 3 % a 200 µl/pocillo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El líquido de cada pocillo se retiró y se añadieron a estos cB273 o TRAIL humano soluble (fabricado por ALEXIS Corporation, n.º ALX-522-003) diluido con PBS que contenía suero bovino fetal al 3 % a 50 µl/pocillo. Después de dejar reposar la placa a temperatura ambiente durante 1,5 horas, se añadió PBS a cada pocillo y después se retiró el líquido del pocillo el cual se lavó dos veces con PBS. Después, al pocillo al cual se había añadido el anticuerpo cB273, se añadió anti IgG humana de cabra específico del F(ab')₂, conjugado con peroxidasa (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-035-097) diluido 2500 veces con PBS que contenía suero bovino fetal al 3 % a 50 µl/pocillo, y al pocillo al cual se había añadido TRAIL soluble, se añadió el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 conjugado con peroxidasa diluido 2000 veces a 50 µl/pocillo y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se añadió PBS a cada pocillo, el líquido se retiró del pocillo y este se lavó dos veces con PBS. Después de esto, se

añadió un líquido revelador de color OPD a 100 µl/pocillo, mediante lo cual se reveló un color. Después, se añadió HCl 1 M a 100 µl/pocillo, mediante lo cual en la reacción de revelado de color se detuvo. Después de esto, se midió la absorbancia a 492 nm usando un lector de placa. La Figura 2A muestra los resultados para cB273, y la Figura 2B muestra los resultados para TRAIL soluble. Los datos en los gráficos se expresan mediante una media ± desviación típica (n = 3). Como resultado, se observó que cB273 se unía selectivamente al dominio extracelular de TRAIL R2 humano.

3) -2 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo cB273 usando Biacore

3) -2-1 Preparación de la proteína de dominio extracelular de DR5 humano

3) -2-1-1 Producción del vector de expresión de la proteína del dominio extracelular de DR5

10 Para construir un vector que expresase una región (en lo sucesivo en el presente documento denominado "sDR5") compuesta por una secuencia de aminoácidos mostrada por los números de aminoácidos 1 a 130 de DR5 humano representada por SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias, se realizó una reacción de PCR usando un conjunto de cebadores para amplificar sDR5: DR5 Ndefw: 5'-gtggcatatggctctgatcaccacaaca-3' (SEQ ID NO: 24 en el Listado de Secuencias) y DR5 Xhorv: 5'-cgctcgcagtgattcttgggacaca-3' (SEQ ID NO: 25 en el Listado de Secuencias) y también usando como molde un ADNc que codificaba un dominio extracelular de DR5 humano. El producto resultante de la PCR se escindió con NdeI y XhoI y se clonó en el sitio NdeI/XhoI de pET21b(+) (fabricado por Novagen, Inc.) (en lo sucesivo en el presente documento abreviado como "pET21b(+)-sDR5"). Además, una proteína recombinante expresada por "pET21b(+)-sDR5" se denominó "rsDR5" (SEQ ID NO: 26 en el Listado de Secuencias) en lo sucesivo en el presente documento y en los dibujos.

20 3) -2-1-2 Producción de la proteína de dominio extracelular de DR5 (rsDR5)

Escherichia coli Origami B (DE3) (fabricada por Novagen, Inc.) se transformó con el plásmido de expresión pET21b(+)-sDR5 y se cultivó en medio 2-YT complementado con ampicilina 100 µg/ml (fabricado por Sigma Co., Ltd.) y kanamicina 15 µg/ml (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y se indujo la expresión de una proteína parcial de DR5 por la adición de IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos y se suspendieron en un tampón de unión (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM), seguido de homogeneización con ultrasonido en hielo. El homogeneizado resultante se centrifugó a 25.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se recuperó y se aplicó a Ni-NTA (fabricado por Invitrogen Corporation). Después de realizar el lavado con el tampón de unión, se realizó la elución con un tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM e imidazol 300 mM). La muestra eluida se dializó con un tampón de diálisis (Tris-HCl 50mM, pH 8,0, NaCl 20 mM) y se aplicó a Mono Q y se realizó una elución en gradiente con un tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 1 M NaCl). La muestra eluida se purificó adicionalmente mediante cromatografía de columna con filtración en gel (Superdex 75 16/60, fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) usando PBS como disolvente. La concentración de la proteína recombinante así obtenida se midió a UV 280 nm (constante de absorbancia molar: 14855).

35 3) -2-2 Medición de la actividad de unión usando Biacore

La constante de disociación de cada uno del anticuerpo cB273 y rsDR5 se midió usando Biacore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) mediante un procedimiento de captura en el que un anticuerpo se capturó mediante un anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado y la medición se realizó usando un antígeno como un analito. El anticuerpo anti IgG (Fc) humano (Kit de Captura de Anticuerpos Humanos, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) se inmovilizó de manera covalente sobre una microplaca detectora CM5 (Biacore, Inc.) a aproximadamente 8000 UR mediante un procedimiento de acoplamiento con amina. La inmovilización se realizó también sobre una célula de referencia de la misma manera. Como un tampón de desarrollo, se usó HBS-EP (HEPES 10 pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 a 0,05 %). Sobre la microplaca que tenía el anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado sobre la misma, se añadió una solución de anticuerpo cB273 50 nM a un caudal de 10 µl/min durante 60 segundos, y después, se añadió una serie de dilución de rsDR5 (0,63-20 nM) a un caudal de 30 µl/min durante 60 segundos y posteriormente, se monitorizó la fase de disociación durante 300 segundos. Como una solución de regeneración, se añadió cloruro de magnesio 3 M a un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos. En el análisis de los datos, se usó el programa informático de análisis (programa informático BIAevaluation, versión 3.1) con un modelo de unión individualizado y se calculó la constante de velocidad de asociación (kon), la constante de velocidad de disociación (koff) y la constante de disociación (KD; KD = koff/kon). En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos de la medición usando Biacore para el anticuerpo cB273.

3) -3 Efecto citocida *in vitro* del anticuerpo cB273 en líneas celulares de cáncer humano

El efecto citocida del anticuerpo cB273 sobre diversas líneas celulares de cáncer se estudió mediante el siguiente procedimiento. En la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) se adquirieron A2780, SK-OV-3, SK-CO-1, Caov-3 y NIH:OVCAR-5 (todas ellas son líneas celulares de cáncer de ovario humano), HCT-15, COLO 205, HT29, SW480, SW620, DLD-1, COLO 201 y WiDr (todas ellas son líneas celulares de cáncer de colon humano), NCI-H1975, NCI-H292, NCI-H460 y NCI-H358 (todas ellas son líneas celulares de cáncer de pulmón humano), MDA-MB-231 y ZR-75-1 (las dos son líneas celulares de cáncer de mama humano). Cada una de estas líneas celulares se

preparó a 1×10^5 células/ml con un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (fabricado por Hyclone Laboratories, Inc.) (en lo sucesivo en el presente documento denominado como “el medio”) y se sembraron a 50 μ l/pocillo en una microplaca de 96 pocillos blanca de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated). El anticuerpo cB273 se preparó a 20000 ng/ml con una solución 1 μ g/ml de un anticuerpo secundario (anti IgG Fc humano de cabra, fabricado por MP Biomedicals, LLC.) y después se preparó a 2000, 200, 20 y 2 ng/ml con el medio, y cada una de las soluciones resultantes se añadió a la placa a 50 μ l/pocillo (la concentración final del anticuerpo: 10000, 1000, 100, 10, y 1 ng/ml). Después, de incubar la placa en condiciones de 37 °C y con CO₂ al 5 % durante 72 horas, en cada pocillo se midió la cantidad de ATP procedente de células viables, usando un kit de Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571) con un luminómetro (fabricado por Berthold Technologies) de acuerdo con el protocolo adjunto. Un pocillo al cual se añadió el medio y la suspensión celular se preparó como un pocillo de control negativo y un pocillo al cual solo se añadió el medio se preparó como un pocillo de fondo, y se calculó la viabilidad celular en cada pocillo de ensayo. En la Figura 4, se muestra una media \pm desviación típica (n = 3) de la viabilidad celular para cada línea celular de cáncer tratada con el anticuerpo cB273. El anticuerpo cB273 exhibió una actividad citocida contra las líneas celulares excepto contra la de SK-CO-1

Se estudió un efecto citocida *in vitro* sobre diversas líneas celulares de cáncer usando, como objeto del ensayo, BxPC-3 y MIA PaCa-2 (ambas de ellas líneas celulares de cáncer de páncreas humano), A2058 y A375 (ambas de ellas son líneas celulares de melanoma humano), U-87MG (una línea celular de glioblastoma humano), AN3CA (una línea celular de cáncer endometrial humano). Cada una de estas líneas celulares se preparó a $4,4 \times 10^4$ células/ml con un medio que contenía FBS al 10 % y se añadió a 45 μ l/pocillo en una microplaca de 96 pocillos blanca de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated), y la placa se incubó durante una noche en condiciones de 37 °C y con CO₂ al 5 %. El anticuerpo cB273 se mezcló con la misma concentración de anti IgG Fc humano de cabra (fabricado por MP Biomedicals, LLC.) y después la mezcla resultante se añadió a la placa a 5 μ l/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo cB273 fuera de 10.000 a 1 ng/ml, y la placa se incubó a 37 °C y con CO₂ al 5 % durante 24 horas. La cantidad de ATP procedente de células viables en cada pocillo se midió usando un Kit de Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571) con un luminómetro (fabricado por Perkin Elmer Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto. Cada gráfico muestra la viabilidad celular expresada por la media \pm desviación típica (n = 3). Como resultado, el anticuerpo cB273 exhibió un efecto citocida en todas las líneas celulares de cáncer estudiadas (Fig. 5).

[Ejemplo 4] Identificación del epítipo del anticuerpo cB273

4) -1 Producción del fragmento Fab de cB273

El anticuerpo cB273 se dializó con PBS y después se diluyó a 2 mg/ml con PBS y se preparó a un volumen final de 17 ml. A esto, se añadió cisteína (fabricada por Sigma Co., Ltd.) preparada a 0,1 mM con PBS en una cantidad de 1,7 ml y papaína (fabricada por Sigma Co., Ltd.) diluida a 0,1 mg/ml con PBS en una cantidad de 2,04 ml y se dejó continuar la reacción a 37 °C durante 5 horas, después las cuales, a esto se le añadió N-etilmaleimida (fabricada por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) disuelta a 120 mM en PBS en una cantidad de 6,33 ml para detener la reacción. La solución de reacción se añadió a Superdex 200 26/60 (fabricado por GE Healthcare, Co., Ltd.) equilibrado con Tris-HCl 50 mM que contenía NaCl 20 mM, y se recogieron 14 ml de una fracción correspondiente al fragmento Fab.

4)-2 Preparación de la muestra del complejo fragmento Fab de cB273 - rsDR5

El fragmento Fab de cB273 se concentró a 9,46 mg/ml usando Amicon Ultra-15 (MWCO: 10 K) (fabricado por Millipore Co., Ltd.) y 2 ml del fragmento Fab de cB273 así concentrado se mezcló con 2 ml de rsDR5 concentrado a 5,6 mg/ml usando Amicon Ultra-15 (MWCO: 3 K) y la mezcla resultante se añadió a Superdex 200 16/60 equilibrado con Tris-HCl 20 mM que contenía NaCl 50 mM.

Se recogieron 8 ml de una fracción correspondiente al complejo.

4) -3 Cristalización y análisis estructural del complejo fragmento Fab de cB273 - rsDR5

El complejo Fab cB273-rsDR5 así obtenido se concentró a 25 mg/ml, que se usó para la cristalización. Para la cristalización, se usó un procedimiento de difusión con vapor. Una solución obtenida añadiendo una misma cantidad de una solución precipitante (polietilenglicol 4000 del 6 al 8 % (p/v), isopropanol al 20% (v/v), cloruro de litio 0,1 M, tampón citrato 0,1 M (pH 5,6)) de 0,45 a 1,0 μ l de una solución proteica se colocó en un envase hermético al aire, en el que ya se habían puesto 0,45 ml de la solución precipitante, de tal manera que ambas soluciones no se habían puesto en contacto entre sí y el recipiente se dejó en reposo a una temperatura de 22 °C. Después de 3 días, se obtuvo un cristal en forma de placa (0,4 mm x 0,3 mm x 0,03 mm).

El cristal así obtenido se sumergió en la solución precipitante complementada con glicerol al 30 % (v/v), y después se congeló en una corriente con nitrógeno a -180 °C. Se recogieron datos de difracción de rayos X en una corriente de nitrógeno a 95 K en BL17A en la Photon Factory of the Institute of Materials Structure Science in the High Energy Accelerator Research Organization. A partir de la imagen de difracción obtenida, se cuantificó una intensidad de difracción usando el programa informático HKL-2000 (producido por HKL Research, Inc.), y se calcularon los factores de la estructura cristalina. El cristal obtenido pertenecía al sistema monoclinico, el grupo de simetría

espacial fue C2 y el cristal tenía los parámetros unitarios celulares: $a = 152,0 \text{ \AA}$, $b = 75,5 \text{ \AA}$, $c = 116,3 \text{ \AA}$, y $\beta = 110,2$.

Se realizó un procedimiento de reemplazo molecular usando los factores de estructura obtenidos de este modo y se determinaron las coordenadas de la estructura tridimensional de DR5 (código PDB: 2H9G) y de Herceptina Fab (código PDB: 1N8Z) y las fases. En el cálculo, se usó un programa informático Phaser (CCP4: Collaborative Computational Project n.º 4). El cristal contenía dos complejos en la unidad asimétrica.

La estructura se refinó usando el programa informático CNX (Accerlys Inc.), y el modelo se corrigió usando el programa informático Coot. Este procedimiento se repitió, y se obtuvo un valor R final de 25,0 % y un valor R libre de 28,7 % a una resolución de 2,1 \AA . El modelo final estaba compuesto por dos complejos y contenía los restos de aminoácidos 1 a 218 de la cadena L de Fab de cB273 (ambas moléculas), los restos de aminoácidos 1 a 222 de la cadena H (ambas moléculas), los restos de aminoácidos 18 a 92 y 98 a 127 de una molécula de DR5 entre las dos moléculas, los restos de aminoácidos 21 a 92 y 98 a 127 de la otra molécula de DR5 y 324 moléculas de agua. No se observó densidad electrónica clara para los restos de aminoácidos 93 a 97 de DR5, los restos 17 o 20 en el extremo N de DR5, 6 restos y una etiqueta de His en el extremo C de DR5, un resto en el extremo C de la cadena L de Fab de cB273 y 5 restos en el extremo C de la cadena H de Fab de cB273, y por lo tanto, no se construyó un modelo. El modelo se validó mediante una representación gráfica de Ramachandran y se descubrió que solo la Val 56 de la cadena L estaba localizada fuera de la región permitida y que este aminoácido, Val 56, tenía una estructura característica de CDR L2.

Las interacciones determinadas entre el DR5 y el Fab de cB273 eran sustancialmente iguales en las dos moléculas en la unidad asimétrica. Los restos de aminoácidos (la posición de cada resto de aminoácido corresponde a la de SEQ ID NO: 23) de DR5 que se encontraban a una distancia de 4 \AA o menor desde el Fab de cB273 eran los siguientes: Gly26, Ile34, Glu36, Asp37, Gly38, Asp56, Leu57, Leu58, Phe59, Leu61 y Arg62. La Figura 6 muestra un modelo de cinta de todo el complejo y de su superficie y la Figura 7 muestra la interacción entre el DR5 y la cadena H o L del Fab de cB273.

[Ejemplo 5] Humanización del anticuerpo cB273 (1)

5) -1 Diseño de B273 humanizado (hB273)

5) -1-1 Modelado molecular de las regiones variables de B273

El modelado molecular de las regiones variables de B273 se realizó de acuerdo con un procedimiento en general conocido como modelado de homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Las secuencias primarias (estructuras tridimensionales procedentes de las estructuras cristalinas de rayos X disponibles) de las regiones variables de la inmunoglobulina humana registradas en el Banco de Datos de Proteínas (Nuc. Acid Res. 28, 235-242 (2000)) se compararon con las regiones variables de B273 determinadas anteriormente. Como resultado, se seleccionó 1T66 como una secuencia que tenía la homología de secuencia más alta con la región variable de cadena ligera de B273. Adicionalmente, se seleccionó 1XIW como una secuencia que tenía la secuencia de homología más alta con la región variable de cadena pesada de B273. La estructura tridimensional de una región marco conservada se preparó basándose en un "modelo estructural" combinando las coordenadas de 1T66 y 1XIW correspondientes a la cadena ligera y cadena pesada de B273. Para las CDR, CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 y CDRH2 de B273 se asignaron los grupos de 16A, 7A, 9A, 10A, y 10A, respectivamente, de acuerdo con la clasificación de Thornton y col. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)). La CDRH3 se clasificó en k(11) - de acuerdo con las normas H3 (FEBS letters 399, 1-8 (1996)). Posteriormente, la confirmación representativa de cada CDR se incorporó en el modelo estructural.

Finalmente, para obtener un posible modelo molecular de la región variable de B273 en cuanto a energía, se realizó un cálculo de energía excluyendo contactos interatómicos desfavorables. El procedimiento anterior se llevó a cabo usando el programa de predicción de estructura terciaria de proteínas Prime, disponible en el comercio, y un programa de búsquedas coordinado MacroModel (Schrödinger, LLC).

5) -1-2 Diseño de la secuencia de aminoácidos de B273 humanizado

Se construyó un anticuerpo B273 humanizado de acuerdo con un procedimiento en general conocido como injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Se seleccionó un anticuerpo aceptor basándose en la homología de aminoácidos dentro de la región marco conservada.

La secuencia de la región marco conservada de B273 se comparó con todas las secuencias marco conservadas humanas de la base de datos de Kabat (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo HuMc3 como un aceptor basándose en una homología de secuencia del 76 % en la región marco conservada. Los restos de aminoácidos en la región marco conservada de HuMc3 se alinearon con los restos de aminoácidos de B273, y se identificaron las posiciones donde se utilizaban diferentes aminoácidos. Las posiciones de estos restos se analizaron usando el modelo tridimensional de B273 construido anteriormente. Después, los restos donadores se injertaron sobre el aceptor se seleccionaron de acuerdo con los criterios proporcionados por Queen y col., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

Transfiriendo algunos restos donadores seleccionados al anticuerpo aceptor, se construyeron secuencias de B273 humanizado como se describe en el siguiente Ejemplo.

5)-1-2 Humanización de la cadena ligera de B273

5)-1-2-1 cadena ligera de tipo hB273_L1:

5 Una cadena ligera de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 22 (valina), 27 (treonina), 34 (serina), 35 (leucina), 37 (ácido aspártico), 38 (glutamina), 70 (lisina), 108 (leucina), 110 (isoleucina), 112 (fenilalanina), 125 (glicina) y 129 (leucina) de la cadena ligera de cB273, representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias, por isoleucina, serina, treonina, prolina, ácido glutámico, prolina, glutamina, valina, valina, tirosina, prolina y valina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo hB273_L1".

10 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1 se representa por SEQ ID NO: 27 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1 se representa por SEQ ID NO: 28 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 27 y 28 también se muestran en la Figura 32.

5)-1-2-2 cadena ligera de tipo hB273_L2:

15 Una cadena ligera de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 37 (ácido aspártico), 38 (glutamina), 108 (leucina), 110 (isoleucina), 125 (glicina) y 129 (leucina) de la cadena ligera de cB273, representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias, por ácido glutámico, prolina, valina, valina, prolina y valina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo hB273_L2".

20 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L2 se representa por SEQ ID NO: 29 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L2 se representa por SEQ ID NO: 30 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 29 y 30 también se muestran en la Figura 33.

5)-1-2-3 cadena ligera de tipo hB273_L3:

25 Una cadena ligera de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 37 (ácido aspártico), 38 (glutamina), 108 (leucina), 110 (isoleucina), y 129 (leucina) de la cadena ligera de cB273, representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias, por ácido glutámico, prolina, valina, valina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo hB273_L3".

30 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L3 se representa por SEQ ID NO: 31 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L3 se representa por SEQ ID NO: 32 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 31 y 32 también se muestran en la Figura 34.

5)-1-3 Humanización de la cadena pesada de B273

5)-1-3-1 cadena pesada de tipo hB273_H1:

35 Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 56 (metionina), 57 (lisina), 59 (serina), 60 (histidina), 62 (lisina), 63 (serina), 67 (isoleucina), 86 (lisina), 87 (alanina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 114 (fenilalanina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEC ID NO: 20 en el listado de secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, valina, arginina, alanina, prolina, metionina, glicina, metionina, arginina, valina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, tirosina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H1".

40 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H1 se representa por SEQ ID NO: 33 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H1 se representa por SEQ ID NO: 34 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 33 y 34 también se muestran en la Figura 35.

5)-1-3-2 cadena pesada de tipo hB273_H2:

50 Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H2".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2 se representa por SEQ ID NO: 35 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2 se representa por SEQ ID NO: 36 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 35 y 36 también se muestran en la Figura 36.

5) 5)-1-3-3 cadena pesada de tipo hB273_H3:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina); 95 (serina), 96 (treonina), 103 (leucina), 10,6 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, treonina, serina, serina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H3".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H3 se representa por SEQ ID NO: 37 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H3 se representa por SEQ ID NO: 38 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de la SEQ ID NO: 37 y 38 también se muestran en la Figura 37.

5)-2 Construcción de vectores de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1, hB273_L2 y hB273_L3

Los ADN que contenían un gen que codificaba una región variable de cadena ligera de tipo hB273_L1, hB273_L2 o hB273_L3 representada por los números de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 28, los números de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 30 o los números de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 32 se sintetizaron (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos por escisión de los ADN sintetizados con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI se insertaron en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, por lo cual se construyeron los vectores de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1, hB273_L2 y hB273_L3. Los vectores de expresión obtenidos de esta manera se denominaron "pEF6KCL/hB273_L1", "pEF6KCL/hB273_L2" y "pEF6KCL/hB273_L3", respectivamente.

5)-3 Construcción de vectores de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H1, hB273_H2 y hB273_H3

Los ADN que contenían un gen que codificaba una región variable de cadena pesada de tipo hB273_H1, hB273_H2 o hB273_H3 representada por los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 34 en el Listado de Secuencias, los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 36 o los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 38 se sintetizaron (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos por escisión de los ADN sintetizados con la enzima de restricción BlnI se insertaron en el vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, por lo cual se construyeron los vectores de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H1, hB273_H2 y hB273_H3. Los vectores de expresión obtenidos de esta manera se denominaron "pEF1FCCU/hB273_H1", "pEF1FCCU/hB273_H2" y "pEF1FCCU/hB273_H3", respectivamente.

5)-4 Preparación de anticuerpos humanizados

5)-4-1 Producción de anticuerpos humanizados

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 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora agitando a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, 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 para plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de polietilimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F. Después de 3 horas, a esto se le añadió Z-VAD-FMK (Peptide Institute, Inc.) a una concentración final de 10 µM y el cultivo se realizó agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ 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 de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H1 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H1/hB273_L1", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H1 y pEF6KCL/hB273_L2 se denominó "hB273_H1/hB273_L2", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H1 y pEF6KCL/hB273_L3 se denominó "hB273_H1/hB273_L3", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2/hB273_L1", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2 y pEF6KCL/hB273_L2 se denominó "hB273_H2/hB273_L2", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2 y pEF6KCL/hB273_L3 se denominó "hB273_H2/hB273_L3", un

anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H3 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H3/hB273_L1", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H3 y pEF6KCL/hB273_L2 se denominó "hB273_H3/hB273_L2" y un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H3 y pEF6KCL/hB273_L3 se denominó "hB273_H3/hB273_L3".

5) 4-2 Purificación de anticuerpos humanizados

El sobrenadante del cultivo obtenido en el apartado 5) 4-1 anterior se purificó mediante un proceso en dos etapas que incluía una cromatografía de afinidad de rProteína A (de 4 a 6 °C) e hidroxiapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación con hidroxiapatita de cerámica a temperatura ambiente. En primer lugar, se aplicaron 1100 a 1200 ml de sobrenadante del cultivo a MabSelect SURE (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectadas en serie) equilibrada con PBS. Después de verter toda la solución del cultivo en la columna, la columna se lavó con 15 a 30 ml de PBS. Posteriormente, se realizó la elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0), y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el tampón se reemplazó con un tampón que contenía fosfato sódico 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, la solución de anticuerpo sometida a reemplazo de tampón se aplicó a una columna de hidroxiapatita cerámica (Japón Bio-Rad Laboratories, Inc., Bio-Scale columna de hidroxiapatita CHT2-1 (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, se realizó una elución en gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el líquido se reemplazó con CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro sódico 140 mM, pH 6,0). Finalmente, la solución resultante se concentró usando un Dispositivo de Filtro Centrifuga UF 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 así obtenida se usó como una muestra purificada.

[Ejemplo 6] Medición de la actividad del anticuerpo B273 humanizado (hB273) (1)

6) 1 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo hB273 usando Biacore

La constante de disociación de cada uno de los anticuerpos anti-DR5 humanizados y rsDR5 se midió usando Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) mediante un procedimiento de captura en el que un anticuerpo se captura mediante un anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado y la medición se realiza usando, como analito, un antígeno. El anticuerpo anti IgG (Fc) humano (Kit de Captura de Anticuerpo Humano, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) se inmovilizó de manera covalente sobre una microplaca detectora CM5 (BIAcore, Inc.) a aproximadamente 10.000 UR mediante un procedimiento de acoplamiento con amina. La inmovilización también se realizó sobre una célula de referencia de la misma manera. Como tampón de desarrollo, se usó HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,05 %). Sobre la microplaca que tenía el anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado en su interior, se añadió una solución de anticuerpo de aproximadamente 20 nM a un caudal de 10 µl/min durante 60 segundos y después, se añadió una serie en dilución de rsDR5 (3,13-50 nM) a un caudal de 30 µl/min durante 120 segundos, y posteriormente, la fase de disociación se monitorizó durante 180 segundos. Se añadió cloruro de magnesio 3 M como una solución de regeneración, a un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos. En el análisis de los datos, se usó un programa de análisis (programa informático de evaluación Biacore T100, versión 2.0.1) con un modelo de unión individualizado y se calculó la constante de velocidad de asociación (kon), la constante de velocidad de disociación (koff) y la constante de disociación (KD; KD = koff/kon). En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos de la medición usando Biacore para los 9 tipos de anticuerpos DR5 humanizados.

6) 2 Actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273 contra líneas celulares de cáncer humano

El fragmento F(ab')₂ de cabra AffiniPure anti IgG humana específico del fragmento Fc (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-006-098) preparado a 50 µg/ml con Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) se dispensó a 45 µl/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated), y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadió el sobrenadante del cultivo de 293F que había permitido producir el anticuerpo en el apartado 5) 4-1, el anticuerpo cB273 purificado (Ejemplo 2-3-2), o IgG humana disponible en el comercio (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 009-000-003) a 50 µl/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo fuera de 150 a 1,5 ng/ml, y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadieron células Jurkat preparadas a 4,0 x 10⁴ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % a 50 µl/pocillo y se cultivaron en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 23 horas. La cantidad de ATP procedente de las células viables se determinó cuantitativamente usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571), y se evaluó el efecto citocida de cada uno de los anticuerpos hB273 tomando como 100 % el valor obtenido de un pocillo en el que se añadió el medio en lugar de la

solución de anticuerpo. Como resultado, como se muestra en la Figura 9, con respecto a la humanización de la cadena pesada de B273, se observó una tendencia de que los anticuerpos que comprendían la cadena pesada de tipo H1 mostraban un efecto citocida ligeramente más bajo que los anticuerpos que comprendían la cadena pesada de tipo H2 o H3. Por otro lado, con respecto a la humanización de la cadena ligera de B273, se descubrió que los anticuerpos que comprendían cualquiera de las cadenas ligeras diseñadas de tipo L1, L2 y L3 podían exhibir sustancialmente el mismo efecto citocida.

[Ejemplo 7] Humanización del anticuerpo cB273 (2)

7)-1 Diseño de B273 humanizado (hB273)

7)-1-1 Diseño de la secuencia de aminoácidos de B273 humanizado

10 Basándose en los resultados del diseño de los anticuerpos humanizados (1) mostrado en los Ejemplos 5 y 6, transfiriendo algunos restos donadores al anticuerpo aceptor, se construyeron secuencias B273 humanizadas como se describe en el siguiente Ejemplo.

7)-1-2 Diseño de la secuencia de aminoácidos de B273 humanizado

7)-1-2-1 cadena pesada de tipo hB273_H1-1:

15 Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 57 (lisina), 59 (serina), 60 (histidina), 62 (lisina), 63 (serina), 67 (isoleucina), 86 (lisina), 87 (alanina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 del Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, arginina, alanina, prolina, metionina, glicina, metionina, arginina, valina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H1-1".

20 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H1-1 se representa por SEQ ID NO: 39 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H1-1 se representa por SEQ ID NO: 40 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 39 y 40 también se muestran en la Figura 38.

7)-1-2-2 cadena pesada de tipo hB273_H2-1:

30 Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H2-1".

35 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-1 se representa por SEQ ID NO: 41 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-1 se representa por SEQ ID NO: 42 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 41 y 42 también se muestran en la Figura 39.

7)-1-2-3 cadena pesada de tipo hB273_H2-2:

40 Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, serina, arginina, treonina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H2-2".

45 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-2 se representa por SEQ ID NO: 43 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-2 se representa por SEQ ID NO: 44 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 43 y 44 también se muestran en la Figura 40.

7)-1-2-4 cadena pesada de tipo hB273_H2-3:

50 Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, serina, arginina, treonina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó

“cadena pesada de tipo hB273_H2-3”.

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-3 se representa por SEQ ID NO: 45 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-3 se representa por SEQ ID NO: 46 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 45 y 46 también se muestran en la Figura 41.

7)-1-2-5 cadena pesada de tipo hB273_H2-4:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó “cadena pesada de tipo hB273_H2-4”.

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-4 se representa por SEQ ID NO: 47 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-4 se representa por SEQ ID NO: 48 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 47 y 48 también se muestran en la Figura 42.

7)-1-2-6 cadena pesada de tipo hB273_H2-5:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó “cadena pesada de tipo hB273_H2-5”.

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-5 se representa por SEQ ID NO: 49 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-5 se representa por SEQ ID NO: 50 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 49 y 50 también se muestran en la Figura 43.

7)-2 Construcción de vectores de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H1-1, hB273_H2-1, hB273_H2-2, hB273_H2-3, hB273_H2-4 y hB273_H2-5

Los ADN que contenían un gen que codificaba una región variable de cadena pesada de tipo hB273_H1-1, hB273_H2-1, hB273_H2-2, hB273_H2-3, hB273_H2-4 o hB273_H2-5 representada por los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 40 en el Listado de Secuencias, los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 42, los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 44, los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 46, los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 48 o los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 50 se sintetizaron (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos mediante escisión de los ADN sintetizados con la enzima de restricción BlnI se insertaron en el vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, por lo que se construyeron los vectores de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H1-1, hB273_H2-1, hB273_H2-2, hB273_H2-3, hB273_H2-4 y hB273_H2-5. Los vectores de expresión así obtenidos se denominaron “pEF1FCCU/hB273_H1-1”, “pEF1FCCU/hB273_H2-1”, “pEF1FCCU/hB273_H2-2”, “pEF1FCCU/hB273_H2-3”, “pEF1FCCU/hB273_H2-4” y “pEF1FCCU/hB273_H2-5”, respectivamente.

7)-3 Preparación de anticuerpos humanizados

7)-3-1 Producción de anticuerpos humanizados

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 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora agitando a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilenimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, 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 para plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de polietilenimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F Después de 3 horas, a esto se le añadió Z-VAD-FMK (Peptide Institute, Inc.) a una concentración final de 10 µM y el cultivo se realizó agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ 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 de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H1-1 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H1-1/hB273_L1", un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-1/hB273_L1", un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-2 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-2/hB273_L1", un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-3 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-3/hB273_L1", un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-4 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-4/hB273_L1", y un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-5 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-5/hB273_L1".

7)-3-2 Purificación de anticuerpos humanizados

El sobrenadante del cultivo obtenido en el apartado 7)-3-1 anterior se purificó mediante un proceso en dos etapas que incluía una cromatografía de afinidad de rProteína A (de 4 a 6 °C) e hidroxapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación con hidroxapatita de cerámica a temperatura ambiente. En primer lugar, se aplicaron 1100 a 1200 ml de sobrenadante del cultivo a MabSelect SURE (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectadas en serie) equilibrada con PBS. Después de verter toda la solución del cultivo en la columna, la columna se lavó con 15 a 30 ml de PBS. Posteriormente, se realizó la elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0), y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el tampón se reemplazó con un tampón que contenía fosfato sódico 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, la solución de anticuerpo sometida a reemplazo de tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita cerámica (Japón Bio-Rad Laboratories, Inc., Bio-Scale columna de hidroxapatita CHT2-1 (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, se realizó una elución en gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el líquido se reemplazó con CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro sódico 140 mM, pH 6,0). Finalmente, la solución resultante se concentró usando un Dispositivo de Filtro Centrifuga UF 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 así obtenida se usó como una muestra purificada.

[Ejemplo 8] Medición de la actividad del anticuerpo B273 humanizado (hB273) (2)

8)-1 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo hB273 usando Biacore

La constante de disociación de cada uno de los anticuerpos anti-DR5 humanizados y rsDR5 se midió usando Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) mediante un procedimiento de captura en el cual un anticuerpo se capturó mediante un anticuerpo anti-IgG (Fc) humano inmovilizado y la medición se realizó usando un anticuerpo como analito. El anticuerpo anti IgG (Fc) humano (Kit de Captura de Anticuerpo Humano, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) se inmovilizó de manera covalente sobre una microplaca detectora CM5 (Biacore, Inc.) a aproximadamente 10.000 UR mediante un procedimiento de acoplamiento con amina. La inmovilización también se realizó sobre una célula de referencia de la misma manera. Como un tampón de desarrollo, se usó HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,05 %). Sobre la microplaca que tenía el anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado en su interior, se añadió una solución de anticuerpo a aproximadamente 20 nM a un caudal de 10 µl/min durante 60 segundos y después, se añadió una serie de dilución de rsDR5 (3,13-50 nM) a un caudal de 30 µl/min durante 120 segundos, y posteriormente, la fase de disociación se monitorizó durante 180 segundos. Como una solución de regeneración, se añadió cloruro de magnesio 3 M a un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos. En el análisis de datos, se usó un programa informático de análisis (programa informático de evaluación Biacore T100, versión 2.0.1) con un modelo de unión individualizado y se calculó la constante de velocidad de asociación (k_{on}), la constante de velocidad de disociación (k_{off}) y la constante de disociación (KD; $KD = k_{off}/k_{on}$). Los resultados obtenidos de la medición usando Biacore para los 6 tipos de anticuerpos DR5 humanizados se muestran en la Figura 10.

8)-2 Actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273 contra líneas celulares de cáncer humano

El fragmento $F(ab')_2$ de cabra AffiniPure anti IgG humana específico del fragmento Fc (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-006-098) preparado a 50 µg/ml con Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) se dispensó a 45 µl/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated), y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadió el sobrenadante del cultivo de 293F que había permitido producir el anticuerpo en el apartado 5)-4-1, el anticuerpo cB273 purificado (Ejemplo 2-3-2), o IgG humana disponible en el comercio (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 009-000-003) a 50 µl/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo fuera de 150 a 1,5 ng/ml, y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadieron células Jurkat preparadas a $4,0 \times 10^4$ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % a 50

µl/pocillo y se cultivaron en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 23 horas. La cantidad de ATP procedente de las células viables se determinó cuantitativamente usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571), y se evaluó el efecto citocida de cada uno de los anticuerpos hB273 tomando como 100 % el valor obtenido de un pocillo en el que se añadió el medio en lugar de la solución de anticuerpo. Como resultado, como se muestra en la Figura 11, se observó una tendencia de que el anticuerpo hB273_H1-1/L1 mostraba una mayor actividad citocida que el anticuerpo hB273_H1/L1, basándose en que anticuerpo del anticuerpo hB273_H1-1/L1 se había diseñado. Por otro lado, los anticuerpos hB273_H2-1/L1 a hB273_H2-5/L1 exhibieron sustancialmente el mismo efecto citocida que el anticuerpo hB273_H2/L1, basándose en que anticuerpo de los anticuerpos hB273_H2-1/L1 a hB273_H2-5/L1 se había diseñado.

10 [Ejemplo 9] Retirada del sitio de desamidación de la CDR del anticuerpo cB273

9)-1 Diseño de mutantes y construcción del vector de expresión

9)-1-1 Diseño de mutante

En general, la desamidación de la asparagina en una proteína se realiza a través de la formación de un estado de transición de succinimida cíclica entre la asparagina y un aminoácido adyacente en el lado C terminal (Geiger, T. y Clarke, S. (1987) Deamidation, Isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. J. Biol. Chem. 262, 785-794). Un factor límite de tasa para la formación de un estado de transición de succinimida cíclica es el tamaño de la cadena lateral del aminoácido adyacente, y por lo tanto, la glicina que tiene la cadena lateral más pequeña puede conseguir la tasa de desamidación más rápida. Por otro lado, sustituyendo el grupo adyacente en el lado C terminal por un aminoácido que tenga una cadena lateral larga, la tasa de desamidación puede suprimirse. El anticuerpo B273 tiene una secuencia -N-G-(asparagina-glicina) que es susceptible a desamidación tanto en la cadena L como en la cadena H. Por lo tanto, los autores de la presente invención produjeron mutantes puntuales en los que el grupo adyacente se cambió de glicina a lisina, fenilalanina, leucina o ácido glutámico, cada uno de los cuales tiene una cadena lateral más larga que la glicina. Es decir, el diseño de los mutantes se realizó de tal manera que en la cadena H, la secuencia -N-G-(asparagina-glicina) se mutó a la secuencia -N-E-(asparagina-ácido glutámico), y en la cadena L, la secuencia -N-G-(asparagina-glicina) se mutó a una secuencia N-L-(asparagina-leucina), a una secuencia -N-F-(asparagina-fenilalanina), a una secuencia -NK-(asparagina-lisina) o a una secuencia -NE-(asparagina-ácido glutámico).

9)-1-2-Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NE

Usando como molde pEF6KCL/hB273_L1, que es el vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1 producido en el Ejemplo 5, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN, obtenido escindiendo el fragmento de ADN así obtenido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, por lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NE en el que la glicina en el aminoácido número 54 de SEQ ID NO: 28 se sustituyó por ácido glutámico. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/hB273_L1-NE".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1-NE se representa por SEQ ID NO: 51 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NE se representa por SEQ ID NO: 52 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de la SEQ ID NO: 51 y 52 también se muestran también en la Figura 44.

Conjunto de cebadores A

5'-aggtaagcttgtagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ccaatgcaggaagtgttctcattgctatggaccagtgactg-3' (L-NE-R2: SEQ ID NO: 54 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

5'-cagtcactggtccatagcaatgagaacacttacctgctggtg-3' (L-NE-F2: SEQ ID NO: 55 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccggttaaacgggccccaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

5'-aggtaagcttgtagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccggttaaacgggccccaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

9)-1-3-Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NF

Usando como molde pEF6KCL/hB273_L1, que es el vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1 producido en el Ejemplo, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un

fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN obtenido por escisión del fragmento de ADN obtenido de esta manera con las enzimas de restricción NheI y PmeI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NF, en el que la glicina en el número de aminoácido 54 de SEQ ID NO: 28 se sustituyó por fenilalanina. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/hB273_L1-NF".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1-NF se representa por SEQ ID NO: 57 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NF se representa por SEQ ID NO: 58 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 57 y 58 también se muestran en la Figura 45.

Conjunto de cebadores A

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)

5'-ccaatgcaggaagtgtgaaattgctatggaccagtgactg-3' (L-NF-R2: SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

5'-cagtcactggtccatagcaattcaacacttacctgcatgg-3' (L-NF-F2: SEQ ID NO: 60 en el Listado de Secuencias)

5'-ggatgccaccctgtaaacgggccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)

5'-ggatgccaccctgtaaacgggccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

9)-1-4 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NK

Usando como molde pEF6KCL/hB273_L1, que es el vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1 producido en el Ejemplo 5, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí por PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el fragmento de ADN así obtenido con las enzimas de restricción NheI y PmeI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NK, en el que la glicina en el número 54 de aminoácido de SEQ ID NO: 28 se sustituyó por lisina. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/hB273_L1-NK".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1-NK se representa por SEQ ID NO: 61 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NK se representa por SEQ ID NO: 62 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 61 y 62 también se muestran en la Figura 46.

Conjunto de cebadores A

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)

5'-ccaatgcaggaagtgttctattgctatggaccagtgactg-3' (L-NK-R2: SEQ ID NO: 63 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

5'-cagtcactggtccatagcaataagaacacttacctgcatgg-3' (L-NK-F2: SEQ ID NO: 64 en el Listado de Secuencias)

5'-ggatgccaccctgtaaacgggccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)

5'-ggatgccaccctgtaaacgggccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

9)-1-5 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NL

Usando como molde pEF6KCL/hB273_L1, que es el vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1 producido en el Ejemplo 5, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el fragmento de ADN así obtenido con las enzimas de restricción NheI y PmeI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NL, en el que la glicina en el aminoácido número 54 de SEQ ID NO: 28 se sustituyó por leucina. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/hB273_L1-NL".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1-NL se representa por SEQ ID NO: 65 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NL se representa por SEQ ID NO: 66 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 65 y 66 también se muestran en la Figura 47.

5 Conjunto de cebadores A

5'-aggtaagcttgtagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ccaatgcaggaagtgttcagattgctatggaccagtgtactg-3' (L-NL-R2: SEQ ID NO: 67 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

10 5'-cagtcactggtccatagcaatctgaacacttacctgattgg-3' (L-NL-F2: SEQ ID NO: 68 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgttaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

5'-aggtaagcttgtagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgttaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

9)-1-6 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE

15 Usando como molde pEF1FCCU/hB273_H2-1, que es el vector de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H2-1, producido en el Ejemplo 5, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el fragmento de ADN así obtenido con las enzimas de restricción NheI y PmeI se insertó en el vector de expresión de

20 cadena pesada del anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó el vector de expresión de cadena pesada de tipo a hB273_H2-1-NE, en el que la glicina en el aminoácido número 74 de SEQ ID NO: 42 se sustituyó por ácido glutámico. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE".

25 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE se representa por SEQ ID NO: 69 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE se representa por SEQ ID NO: 70 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 69 y 70 también se muestran en la Figura 48.

Conjunto de cebadores A

30 5'-aggtaagcttgtagcgccaccatgaacacc-3' (H-F1: SEQ ID NO: 71 en el Listado de Secuencias)
5'-ctggtgtagaagggtcctcgttgtaggggtgaaccggcc-3' (H-NE-R2: SEQ ID NO: 72 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

5'-ggccggttcaaccctacaacgaggacaccttacaaccag-3' (H-NE-F2: SEQ ID NO: 73 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgttaaacggggcccgatatctc-3' (H-R1: SEQ ID NO: 74 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

35 5'-aggtaagcttgtagcgccaccatgaacacc-3' (H-F1: SEQ ID NO: 71 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgttaaacggggcccgatatctc-3' (H-R1: SEQ ID NO: 74 en el Listado de Secuencias)

9)-2 Preparación del anticuerpo hB273 con CDR modificada

9)-2-1 Producción del anticuerpo hB273 con CDR modificada

40 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 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora con agitación a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, un vector de expresión de cadena pesada (0,4 mg) y un vector de expresión de cadena ligera (0,8 mg) preparado con el Kit para plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido de la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido de la mezcla de polietilimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto, la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F. Después de 3 horas se añadió Z-VAD-FMK (Peptide Institute, Inc.) a una concentración final de 10 µM y el cultivo se realizó agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. El sobrenadante del cultivo resultante se filtró a

50 través de un filtro de cápsula desechable (Advantec n.º CCS-045-E1H).

Un anticuerpo de cB273 humanizado, obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE y pEF6KCL/hB273_L1-NE se denominó "hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NE", un anticuerpo de cB273 humanizado

obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE y pEF6KCL/hB273_L1-NF se denominó "hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NF", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK", y un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE y pEF6KCL/hB273_L1-NL se denominó "hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NL".

9)-2-2 Purificación del anticuerpo hB273 con CDR modificada

El sobrenadante del cultivo obtenido en el apartado 9)-2-1 anterior se purificó mediante un proceso en dos etapas que incluía cromatografía de afinidad de rProteína A (de 4 a 6 °C) e hidroxiapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación mediante hidroxiapatita de cerámica a temperatura ambiente. Primero, se aplicaron de 1100 a 1200 ml de sobrenadante del 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 verter toda la solución de cultivo en la columna, esta se lavó con PBS usando de 15 a 30 ml. Posteriormente, se realizó la elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0), y la fracción que contenía el anticuerpo se recogió. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el tampón se reemplazó con un tampón que contenía fosfato sódico 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Adicionalmente, la solución de anticuerpo sometida a reemplazo de tampón se aplicó a una columna de hidroxiapatita de cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., columna de hidroxiapatita Bio-Scale CHT2-1 (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, se realizó una elución de gradiente a concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el líquido se reemplazó con CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0). Finalmente la solución resultante se concentró usando un Dispositivo de Filtro Centrifugal UF VIVASPIN 20 (peso molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 44 °C), y la concentración de IgG se ajustó a 1,0 mg/ml o más, y la solución así obtenida se usó como una muestra purificada.

[Ejemplo 10] Medición de la actividad del anticuerpo B273 con CDR modificada

10)-1 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo hB273 modificado en la CDR usando Biacore

La constante de disociación de cada uno de los anticuerpos anti-DR5 humanizados y rsDR5 se midió usando Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) mediante un procedimiento de captura en el que un anticuerpo se captura mediante un anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado y la medición se realizó usando un antígeno como analito. El anticuerpo anti IgG (Fc) humano (Kit de Captura de Anticuerpo Humano GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) se inmovilizó de manera covalente sobre una microplaca detectora CM5 (BIAcore, Inc.) a aproximadamente 10.000 UR mediante un procedimiento de acoplamiento con amina. La inmovilización se realizó también sobre una célula de referencia de la misma manera. Como tampón de desarrollo, se usó HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensoactivo P20 al 0,05 %). Sobre la microplaca que tenía el anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado en su interior, se añadió una solución de anticuerpo a aproximadamente 20 nM a un caudal de 10 µl/min durante 60 segundos y después, se añadió una serie en dilución de rsDR5 (3,13-50 nM) a un caudal de 30 µl/min durante 120 segundos y posteriormente la fase de disociación se monitorizó durante 180 segundos. Como una solución de regeneración, se añadió cloruro de magnesio 3 M a un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos. En el análisis de los datos, se utilizó un programa informático de análisis (programa informático de evaluación Biacore T100, versión 2.0.1) con un modelo de unión individualizado y se calculó una constante de velocidad de asociación (kon), una constante de velocidad de disociación (koff) y una constante de disociación (KD; KD = koff/kon). En la Fig. 12 se muestran los resultados obtenidos de la medición usando Biacore para los 4 tipos de anticuerpos DR5 humanizados.

10)-2 Medición de la estabilidad térmica del anticuerpo anti-DR5 humanizado y su mutante usando calorimetría de barrido diferencial (DSC)

La medición de la estabilidad térmica se realizó usando calorimetría de barrido diferencial (DSC). Se disolvió una muestra en un tampón CBS (que contenía ácido cítrico 10 mM y NaCl 140 mM y preparado a un pH de 6,0) a 0,5 mg/ml y se usaron partes alícuotas de 400 µl de la misma como soluciones de muestra para la medición DSC. Las condiciones de medición de DSC se establecieron de la siguiente manera: temperatura inicial: 20 °C; temperatura final: 100 °C; velocidad de aumento de temperatura: 200 °C/hora; período de filtración: 2 segundos; y modo de retroalimentación: bajo. Como solución de referencia se usó CBS. Como dispositivo de medición DSC se utilizó la plataforma VP-Capillary DSC fabricada por MicroCal, Inc. (US) (actualmente GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) para todas las mediciones. La corrección de la línea basal se realizó restando la línea basal (una curva de barrido obtenida también llenando una célula de muestra con la solución de referencia) de una curva de barrido obtenida de la solución de muestra. El valor de la temperatura máxima pico en el termograma completo se definió como la Tm del punto medio de desnaturalización térmica de la región Fab. En la Fig. 13 se muestran los resultados de la medición DSC de los 4 tipos de anticuerpos DR5 humanizados.

10)-3 Actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273 con CDR modificada contra líneas celulares de cáncer humano

El fragmento F(ab')₂ de cabra AffiniPure anti IgG humana específico del fragmento Fc (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-006-098) preparado a 50 µg/ml con Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) se dispensó a 45 µl/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated), y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, el sobrenadante del cultivo de 293F, que había permitido producir el anticuerpo en el apartado 9)-2-1, se añadió a 50 µl/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo fuera de 150 a 1,5 ng/ml, y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadieron células Jurkat preparadas a 4,0 x 10⁴ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % a 50 µl/pocillo y se cultivaron en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 23 horas. La cantidad de ATP procedente de las células viables se determinó cuantitativamente usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571), y se evaluó el efecto citocida de cada uno de los anticuerpos hB273 tomando como 100 % el valor obtenido de un pocillo en el que se añadió el medio en lugar de la solución de anticuerpo. En la Fig. 14 se muestra la actividad citocida de cada uno de los 4 tipos de anticuerpos con CDR modificada.

10)-4 Efecto de la activación de caspasa-3/7 y actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK en líneas celulares de cáncer humano

Cada una de una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 y una línea celular de glioblastoma humano U-87MG se preparó a 1,1 x 10⁵ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10% o medio MEM (Medio Esencial Mínimo) que contenía FBS al 10 % y se añadió a una microplaca blanca de 96 pocillos de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated) a 45 µl/pocillo y se cultivó durante una noche en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. El anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK, el anticuerpo cB273, o la IgG humana (fabricada por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) se mezclaron con la misma concentración del fragmento específico AffiniPure de cabra anti-Fc_γ de IgG humana (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-005-098), y la mezcla resultante se añadió a 5 µl/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK, del anticuerpo cB273 o de la IgG humana fuera de 10.000 a 0,1 ng/ml, y las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y con CO₂ al 5 % durante 4 horas. La actividad de la caspasa-3/7 en cada pocillo se midió con un luminómetro (fabricado por Perkin Elmer, Inc.) usando un kit de ensayo Caspasa-Glo 3/7 (fabricado por Promega Corporation, n.º G8093). La medición se realizó después de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Después, la actividad de la caspasa-3/7 se evaluó tomando como 100% el valor obtenido de un pocillo al cual se añadió medio en lugar de la solución de anticuerpo. Además, la actividad citocida *in vitro* se evaluó midiendo la cantidad de ATP después de 24 horas de tratamiento con el anticuerpo de acuerdo con el procedimiento mostrado en el Ejemplo 3-3. Como resultado, se descubrió que el anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK tenía un efecto de activación de caspasa-3/7 y un efecto citocida comparable al del anticuerpo cB273 (Figura 15).

[Ejemplo 11] Efecto antitumoral *in vivo* del anticuerpo cB273.

11)-1 Actividad antitumoral del anticuerpo cB273

11)-1-1 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano COLO 205

Por vía subcutánea, se implantaron 2 x 10⁶ células de una línea celular de cáncer de colon humano, COLO 205 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos (CAN.N.Cg-Foxnltm/Crj, adquiridos en Charles River Laboratories Japón, Inc.). Los días 7, 14 y 21 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola, a una dosis de 1, 3 o 10 mg/kg (n = 10). El eje mayor y el eje menor del tumor implantado se midieron dos veces a la semana usando un calibrador digital electrónico (fabricado por Mitutoyo Corporation), y el volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula de cálculo:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 1/2 \times (\text{eje menor})^2 (\text{mm}) \times (\text{eje mayor})^2 (\text{mm})$$

Los resultados se muestran en la Figura 16. En todos los ratones del grupo al cual se administró el anticuerpo cB273 se observó degeneración completa del tumor.

11)-1-2 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de páncreas humano MIAPaCa-2

Por vía subcutánea se implantaron 3 x 10⁶ células de una línea celular de cáncer de páncreas humano, MIAPaCa-2 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 11, 19, 26 y 33 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola, a una dosis de 3 o 10 mg/kg (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 17. La tasa inhibitoria del crecimiento tumoral el día 39 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 73,5 % en el grupo al que se administró la dosis de 3

mg/kg y de 77,4 % en el grupo al que se administró la dosis de 10 mg/kg.

11)-1-3 Actividad antitumoral en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de glioblastoma humano U-87MG

5 Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de glioblastoma humano, U-87MG (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 4, 11, 18 y 25 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola, a una dosis de 1, 3 o 10 mg/kg ($n = 10$). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

10 Los resultados se muestran en la Figura 18. La tasa inhibitoria del crecimiento tumoral el día 32 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 99,7 % en el grupo al que se administró la dosis de 1 mg/kg, de 97,8 % en el grupo al que se administró la dosis de 3 mg/kg y de 98,0 % en el grupo al que se administró la dosis de 10 mg/kg. Además, la degeneración completa del tumor se observó en 2 ratones de 10 en el grupo al que se administró la dosis de 1 mg/kg, en 5 ratones de 10 en el grupo al que se administró la dosis de 3 mg/kg y de 3 ratones de 10 en el grupo al que se administró la dosis de 10 mg/kg.

15 11)-1-4 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H2122 (en combinación con paclitaxel y carboplatino)

20 Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de cáncer de pulmón humano, NCI-H2122 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 13 y 20 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. El paclitaxel se administró por vía subcutánea a una dosis de 6,25 mg/kg los días 13, 14, 15, 16 y 17 después de la implantación. El carboplatino se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 100 mg/kg el día 13 después de la implantación ($n = 10$). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

25 Los resultados se muestran en la Figura 19. La tasa inhibitoria del crecimiento tumoral el día 41 después de la implantación, que era el último día del tratamiento, fue de 99,6 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 10,2 % en el grupo al que se administró la combinación de paclitaxel y carboplatino y de 99,7 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273, paclitaxel y carboplatino.

11)-1-5 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H460 (en combinación con paclitaxel y carboplatino)

30 Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de cáncer de pulmón humano, NCI-H460 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. El día 6 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró por vía intraperitoneal a ratones portadores de tumores a una dosis de 10 mg/kg. El paclitaxel se administró por vía subcutánea a una dosis de 6,25 mg/kg los días 6, 7, 8, 9 y 10 después de la implantación. El carboplatino se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 100 mg/kg el día 6 después de la implantación ($n = 10$). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

35 Los resultados se muestran en la Figura 20. La tasa inhibitoria de crecimiento tumoral el día 16 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 43,3 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 66,4 % en el grupo al que se administró la combinación de paclitaxel y carboplatino y de 79,6 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273, paclitaxel y carboplatino

11)-1-6 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano DLD-1 (en combinación con CPT-11)

45 Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de cáncer de colon humano, DLD-1 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. El día 35 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró por vía intraperitoneal a ratones portadores de tumores a una dosis de 10 mg/kg. CPT-11 se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 80 mg/kg los días 35, 40 y 43 después de la implantación ($n = 10$). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

50 Los resultados se muestran en la Figura 21. La tasa inhibitoria del crecimiento tumoral el día 55 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 25,9 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 29,5 % en el grupo al que se administró CPT-11 y de 72,7 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273 y CPT-11.

11)-1-7 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 (en combinación con CPT-11)

Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de cáncer de colon humano, HCT-15 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. El día 7 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola, a una dosis de 10 mg/kg. CPT-11 se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 80 mg/kg los días 7, 10 y 14 después de la implantación (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 22. La tasa inhibitoria del crecimiento tumoral el día 31 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 52,8 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 83,5 % en el grupo al que se administró CPT-11 y de 97,8 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273 y CPT-11.

11)-1-8 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano HCT-116 (en combinación con CPT-11)

Por vía subcutánea, se implantaron 1×10^7 células de una línea celular de cáncer de colon humano, HCT-116 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. El día 7 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. CPT-11 se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 65 mg/kg los días 7, 10 y 14 después de la implantación (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 23. La tasa inhibitoria del crecimiento tumoral el día 28 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 13,9 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 89,8 % en el grupo al que se administró CPT-11 y de 99,7 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273 y CPT-11.

11)-1-9 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de melanoma humano A375 (en combinación con vinblastina)

Por vía subcutánea, se implantaron 2×10^6 células de una línea celular de melanoma humano, A375 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 10, 17 y 24 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. La vinblastina se administró a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg 10 días después de la implantación (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 24. La tasa inhibitoria del crecimiento tumoral el día 46 después del implante, que era el último día de la medición, fue de 53,1% en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 43,6% en el grupo al que se administró vinblastina y del 100% en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273 y vinblastina, y en todos los ratones en el grupo de administración combinada del anticuerpo cB273 y vinblastina se observó degeneración completa del tumor.

11)-2 Comparación de la actividad antitumoral entre el anticuerpo cB273 y conatumumab

11)-2-1 Preparación de conatumumab

Conatumumab se preparó basándose en las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas descritas en el WHO Drug Information, Vol. 22, n.º 2, 2008, págs. 129-130.

11)-2-1-1 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de conatumumab

Se sintetizó un ADN que contenía un gen que codificaba una región variable de cadena ligera de conatumumab representada por los números de aminoácidos 21 a 130 de SEQ ID NO: 76 (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después, un fragmento de ADN obtenido por escisión del ADN sintetizado con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de conatumumab. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó "pEF6KCL/Conatumumab_L".

11)-2-1-2 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de conatumumab

Se sintetizó un ADN que contenía un gen que codificaba una región variable de cadena pesada de conatumumab representada por los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 78 en el Listado de Secuencias (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después un fragmento de ADN obtenido por escisión del ADN sintetizado con la enzima de restricción BlnI se insertó en el vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, mediante lo cual se construyó el vector de expresión de cadena pesada de conatumumab. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó

“pEF1FCCU/Conatumumab H”.

11)-2-1-3 Producción de conatumumab

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 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora con agitación a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, el vector de expresión de cadena pesada pEF1FCCU/Conatumumab_H (0,4 mg) y el vector de expresión de cadena ligera pEF6KCL/Conatumumab_L (0,8 mg) preparados con el Kit para Plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido de la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido de la mezcla de polietilimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto, la mezcla se añadió a células FreeStyle 293F y se realizó el cultivo agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. El sobrenadante del cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec n.º CCS-045-E1H).

11)-2-1-4 Purificación de conatumumab

El sobrenadante del cultivo obtenido en el apartado 11)-2-1-3 anterior se purificó mediante un proceso en dos etapas que incluía cromatografía de afinidad de rProteína A (de 4 a 6 °C) e hidroxapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación mediante hidroxapatita de cerámica a temperatura ambiente. En primer lugar, se aplicaron de 1100 a 1200 ml de sobrenadante del 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 verter toda la solución del cultivo en la columna, esta columna se lavó con PBS de 15 a 30 ml. Posteriormente, se realizó elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0) y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el tampón se reemplazó POR un tampón que contenía fosfato de sodio 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, la solución de anticuerpo sometida a reemplazo de tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita de cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., columna de hidroxapatita Bio-Scale CHT2-1 (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, se realizó elución en gradiente a concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el líquido se reemplazó por CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0). Finalmente la solución resultante se concentró usando el Dispositivo Centrifugal UF Filter 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 así obtenida se usó como una muestra purificada.

11)-2-2 Comparación de la actividad antitumoral en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 entre el anticuerpo cB273 y conatumumab

Por vía subcutánea, se implantaron 1×10^7 células de una línea celular de cáncer de colon humano, HCT-15 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 6, 13 y 20 después de la implantación, se administró el anticuerpo cB273 o conatumumab a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 3, 10 o 30 mg/kg (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Fig. 25. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 30 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 57,9 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 3 mg/kg, de 56,0 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 10 mg/kg, de 53,6 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 30 mg/kg, de 27,4 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 3 mg/kg, de 26,9 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 10 mg/kg y de 20,3 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 30 mg/kg.

11)-2-3 Comparación de la actividad antitumoral en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H1975 entre el anticuerpo cB273 y conatumumab

Por vía subcutánea, se implantaron 3×10^6 células de una línea celular de cáncer de pulmón humano, NCI-H1975 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 12, 19 y 26 después de la implantación, el anticuerpo cB273 o conatumumab se administraron a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 3 o 10 mg/kg (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 26. La tasa inhibidora de crecimiento tumoral el día 32 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 71,5 % en el grupo al que se administró el anticuerpo

cB273 a la dosis de 3 mg/kg, de 73,3 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 10 mg/kg, de 13,5 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 3 mg/kg y de 12,6 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 10 mg/kg.

[Ejemplo 12] Efecto antitumoral *in vivo* del anticuerpo hB273_H2-1-NE/ hB273-L1-NK

- 5 12)-1 Actividad antitumoral del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano COLO 205

10 Por vía subcutánea, se implantaron 2 x 10⁶ células de una línea celular de cáncer de colon humano, COLO 205 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 8, 15 y 22 después de la implantación, se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK o el anticuerpo cB273 a ratones portadores de tumor a través de la vena de la cola a una dosis de 0,3 o 3 mg/kg (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

15 Los resultados se muestran en la Figura 27. Se observó degeneración completa del tumor en todos los ratones del grupo al que se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK a la dosis de 3 mg/kg y en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 0,3 mg/kg. Adicionalmente, se observó degeneración completa del tumor en 9 ratones de 10 en el grupo al que se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK a una dosis de 0,3 mg/kg, y en 8 ratones de 10 en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a una dosis de 3 mg/kg.

[Ejemplo 13] Actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273_H2-1-NE/ hB273-L1-NK contra líneas celulares de cáncer humano

20 NCI-N87, KATO-III y SNU-16 (cada una de las cuales es una línea de células de cáncer de estómago humano), Caki-1, ACHN y 786-0 (cada una de las cuales es una línea celular de cáncer renal humano), Hep3B, SK-HEP-1 y HepG2 (C3A) (cada de las cuales es una línea celular de cáncer de hígado humano) y HT-1080 (que es una línea celular de fibrosarcoma humano) se adquirieron en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC). GCIY (que es una línea celular de cáncer de estómago humano) se adquirió en RIKEN. HuH-7 (que es una línea celular de cáncer de hígado humano) se adquirió en el Instituto Nacional de Innovación Biomédica.

25 Las actividades citocidas *in vitro* contra diversos tipos de líneas celulares se midieron mediante el siguiente procedimiento. En cuanto a la línea celular de cáncer de estómago, la línea celular de cáncer renal y la línea celular de fibrosarcoma, células apropiadamente subcultivadas se contaron mediante un procedimiento de tinción con azul de tripano y después de esto se prepararon a 1 x 10⁵ células/ml en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (fabricado por Hyclone Laboratories, Inc.) (en lo sucesivo en el presente documento denominado como "el medio").
30 En el medio, se mezclaron el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK a 20 µg/ml y un anticuerpo secundario (anticuerpo anti IgG humano de cabra, fabricado por MP Biomedicals, LLC.) a 40 µg/ml. Después, la mezcla resultante se diluyó con el medio, por lo cual se prepararon soluciones de tal manera que la concentración del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK era de 2000, 200, 20 o 2 ng/ml. Cada una de las soluciones resultantes, que tenían las concentraciones respectivas, se añadieron a una microplaca de 96 pocillos transparentes (fabricada por Corning Incorporated) a 50 µl/pocillo (3 pocillos por grupo) y la suspensión celular se sembró a 50 µl/pocillo (5 x 10³ células) (concentración final del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK: 10000, 1000, 100, 10 o 1 ng/ml).

40 En cuanto a la línea celular de cáncer de hígado, células apropiadamente subcultivadas se contaron mediante un procedimiento de tinción con azul de tripano y después de esto se prepararon a 4 x 10⁴ células/ml en el medio. En el medio, se mezclaron el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK a 2 µg/ml y el anticuerpo secundario a 4 µg/ml. Después, la mezcla resultante se diluyó con el medio, por lo cual las soluciones se prepararon de tal manera que la concentración del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK era de 200, 20, 2, 0,2, o 0,02 ng/ml. Cada una de las soluciones resultantes que tenían las concentraciones respectivas se añadieron a una microplaca negra de 96 pocillos de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated) a 50 µl/pocillo (2 pocillos por grupo), y la suspensión celular se sembró a 50 µl/pocillo (2 x 10³ células) (concentración final del anticuerpo: 1000, 100, 10, 1, 0,1 o 0,01 ng/ml).

50 Las células se cultivaron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % durante 72 horas y se midió la cantidad de ATP en cada pocillo. La medición de la cantidad de ATP se realizó usando un reactivo luminiscente de luciferasa (CellTiter-Glo, fabricado por Promega Corporation) de acuerdo con el protocolo adjunto. Es decir, a la placa de 100 µl por pocillo, se añadió una solución de ensayo compuesta por un componente de lisado celular y un componente de sustrato luminiscente, seguido de agitación. Después de esto, se midió la luminiscencia de cada pocillo usando un luminómetro (fabricado por Berthold Technologies). En cuanto a la línea celular de cáncer de estómago, la línea celular de cáncer renal y la línea celular de fibrosarcoma, una solución de ensayo en una cantidad de 100 µl por pocillo, se transfirió de la microplaca de 96 pocillos transparentes a una microplaca blanca de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated), y después, se midió la luminiscencia.

55 Un pocillo, al cual se añadió el medio y la suspensión celular, se preparó como un pocillo de control negativo, un pocillo, al cual solo se añadió medio se preparó como un pocillo de fondo y la viabilidad celular en cada pocillo de ensayo se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula.

Viabilidad celular (%) = (intensidad de luminiscencia del pocillo de ensayo - intensidad de luminiscencia promedio del pocillo de fondo)/(intensidad de luminiscencia promedio del pocillo de control negativo - intensidad de luminiscencia promedio del pocillo de fondo) x 100

5 En la Figura 51, se muestra un promedio de la viabilidad celular de cada línea celular para las concentraciones respectivas del anticuerpo usado en el tratamiento. En cuanto a la línea celular de cáncer de estómago, la línea celular de cáncer renal y la línea celular de fibrosarcoma, un error típico se representó mediante una barra de error. El anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK exhibió una actividad citotóxica contra todas las líneas celulares ensayadas excepto para 786-O.

10 [Ejemplo 14] Medición de la actividad *in vivo* del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK en combinación con un agente quimioterapéutico

14)-1 Actividad antitumoral del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK en combinación con 5-FU en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 y comparación de actividad con conatumumab

15 Por vía subcutánea, se implantaron 1×10^7 células de una línea celular de cáncer de colon humano, HCT-15 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos (CAnN.Cg-Foxnl^{tm1.1}/CrjCrlj, adquiridos en Charles River Laboratories Japón, Inc.). Los días 7, 14 y 21 después de la implantación, a través de la vena de la cola, se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/ hB273_L1-NK o conatumumab a ratones portadores de tumores, a una dosis de 3 mg/kg. El 5-FU se administró a través de la vena de la cola el día 7 después de la implantación a una dosis de 160 mg/kg. El experimento se realizó a $n = 6$. El eje mayor y el eje menor del tumor implantado se midieron dos veces a la semana usando un calibrador digital electrónico (fabricado por Mitutoyo Corporation), y el volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula de cálculo:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 1/2 \times (\text{eje menor})^2 (\text{mm}) \times (\text{eje mayor})^2 (\text{mm})$$

25 Los resultados se muestran en la Figura 52. La tasa inhibidora de crecimiento tumoral el día 28 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 62 % en el grupo al que se había administrado el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK, de 27 % en el grupo al que se había administrado conatumumab, de 54 % en el grupo al que se había administrado 5-FU, de 91 % en el grupo al que se había administrado la combinación de anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y 5-FU y de 78 % en el grupo al que se había administrado la combinación de conatumumab y 5-FU. Es decir, se observó un efecto combinado del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y 5-FU, y adicionalmente, en el grupo al que se había administrado la combinación del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y 5-FU se observó una mayor actividad antitumoral en comparación con el grupo al que se había administrado la combinación de conatumumab y 5-FU.

30 14)-2 Actividad antitumoral del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK en combinación con paclitaxel en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H1975 y comparación de actividad con conatumumab

35 Por vía subcutánea, se implantaron 3×10^6 células de una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano, NCI-H1975 (adquirido en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 11, 18 y 25 después de la implantación, a través de la vena de la cola, se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK o conatumumab a ratones portadores de tumores, a una dosis de 3 mg/kg. El paclitaxel se administró, a través de la vena de la cola, a ratones portadores de tumores, los días 11, 12, 13 y 14 después de la implantación, a una dosis de 6,25 mg/kg. El experimento se realizó a $n = 6$. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral

45 Los resultados se muestran en la Figura 53. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 32 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 66 % en el grupo al que se había administrado el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK, de 40 % en el grupo al que se había administrado conatumumab, de 49 % en el grupo al que se había administrado paclitaxel, de 91 % en el grupo al que se había administrado la combinación del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y paclitaxel y de 79 % en el grupo al que se había administrado la combinación de conatumumab y paclitaxel. Es decir, se observó un efecto combinado del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y paclitaxel y adicionalmente, se observó una actividad antitumoral más alta en el grupo de administración combinada del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y paclitaxel en comparación con el grupo de administración combinada de conatumumab y paclitaxel.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

55 <120> Un nuevo anticuerpo anti-DR5

<130> PN807709EPA

<140>
 <141> 27-10-2011

5 <150> JP 2010-243549
 <151> 29-10-2010

<160> 89

10 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 1

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

20 <210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 2

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

Asp Gln Ala Ser
 20

30 <210> 3
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador MH258E1F1

<400> 3
 aagaatcatt gggatggagc tgtatc 26

40 <210> 4
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador G1EVR1

<400> 4
 aagatatctt atttaccagg agagtgggag ag 32

50 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador MK19EIF1

ES 2 675 847 T3

<400> 5
aagaatcatt gaagttgcct gttagg 26

5 <210> 6
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador KEVR1

15 <400> 6
aagatatctt aacactcatt cctgttgaag ct 32

20 <210> 7
<211> 1395
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

25 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1395)

<400> 7

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

ES 2 675 847 T3

aca gcc cac atg gag ctc ctg agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336
 Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

tat ttt tgt gga aga tcg gcg tat tac ttc gat agt ggg ggc tac ttt 384
 Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gcc aaa acg 432
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 130 135 140

aca ccc cca tct gtc tat cca ctg gcc cct gga tct gct gcc caa act 480
 Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
 145 150 155 160

aac tcc atg gtg acc ctg gga tgc ctg gtc aag ggc tat ttc cct gag 528
 Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

cca gtg aca gtg acc tgg aac tct gga tcc ctg tcc agc ggt gtg cac 576
 Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
 180 185 190

acc ttc cca gct gtc ctg cag tct gac ctc tac act ctg agc agc tca 624
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
 195 200 205

gtg act gtc ccc tcc agc acc tgg ccc agc gag acc gtc acc tgc aac 672
 Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn
 210 215 220

gtt gcc cac ccg gcc agc agc acc aag gtg gac aag aaa att gtg ccc 720
 Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro
 225 230 235 240

agg gat tgt ggt tgt aag cct tgc ata tgt aca gtc cca gaa gta tca 768
 Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser
 245 250 255

tct gtc ttc atc ttc ccc cca aag ccc aag gat gtg ctc acc att act 816
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
 260 265 270

ctg act cct aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac atc agc aag gat gat 864
 Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp
 275 280 285

ccc gag gtc cag ttc agc tgg ttt gta gat gat gtg gag gtg cac aca 912
 Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr
 290 295 300

gct cag acg caa ccc cgg gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca 960
 Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser
 305 310 315 320

gtc agt gaa ctt ccc atc atg cac cag gac tgg ctc aat ggc aag gag 1008
 Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335

ttc aaa tgc agg gtc aac agt gca gct ttc cct gcc ccc atc gag aaa 1056
 Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys

ES 2 675 847 T3

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

ES 2 675 847 T3

Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

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

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr
 370 375 380

Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln
 385 390 395 400

Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met
 405 410 415

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

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
 435 440 445

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 9
 <211> 714
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(714)

<400> 9

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

gta cac agt aat gga aac acc tat cta cat tgg tac ctg cag aag cca 192
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

ES 2 675 847 T3

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct	240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
65 70 75 80	
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
85 90 95	
ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat ttc tgc	336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys	
100 105 110	
tct caa agt aca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg	384
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu	
115 120 125	
gaa atc aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca	432
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro	
130 135 140	
tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc ttg	480
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu	
145 150 155 160	
aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag att gat ggc	528
Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly	
165 170 175	
agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act gat cag gac agc	576
Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser	
180 185 190	
aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc acg ttg acc aag gac	624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp	
195 200 205	
gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt gag gcc act cac aag aca	672
Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr	
210 215 220	
tca act tca ccc att gtc aag agc ttc aac agg aat gag tgt	714
Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys	
225 230 235	

<210> 10
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 10

ES 2 675 847 T3

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

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

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

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

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

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

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

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

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

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

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

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220

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

<210> 11
 <211> 28

ES 2 675 847 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador EFF1

<400> 11
ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagc 28

10 <210> 12
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador EFsmaR

<400> 12
aaaccggga gcttttgca aaagcctagg 30

20 <210> 13
<211> 1704
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos del péptido señal, de la región Fc y de la señal de adición de poli A de la cadena kappa humana

30 <400> 13

ES 2 675 847 T3

ggtaccaccc aagctggcta ggtaagcttg ctagcgccac catggtgctg cagacccagg 60
 tgttcatctc cctgctgctg tggatctccg gcgcatatgg cgatatcgtg atgattaaac 120
 gtacggtggc cgccccctcc gtgttcatct tccccctc cgacgagcag ctgaagtccg 180
 gcaccgcctc cgtggtgtgc ctgctgaata acttctacc 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
 cccagtgcct ctctggccc tggagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaat 540
 aaaattaagt tgcattcatt tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tggggtggag 600
 gggggtggtg tggagcaagg ggcaagttgg gaagacaacc tgtaggcct gcggggtcta 660
 ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc actgcaatct ccgcctcctg 720
 ggttcaagcg attctcctgc ctgagcctcc cgagttggtg ggattccagg catgcatgac 780
 caggctcacc taatttttgt ttttttgta gagacggggt ttcacatat tggccaggct 840
 ggtctccaac tcctaattct aggtgatcta cccaccttgg cctcccaaat tgctgggatt 900
 acaggcgtga accactgctc cacgcgcctt gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg 960
 tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcctcct cctttcgctt 1020
 tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc 1080
 tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg 1140
 gtgatggttc acgtagtggg ccctcgcctt gatagacggg ttttcgcctt ttgacgttgg 1200
 agtccacggt cttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct 1260
 cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg 1320

 agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc agttaggggtg 1380
 tggaaagtcc ccaggetccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc 1440
 agcaaccagg tgtggaaagt cccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca 1500
 tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc 1560
 gccagttcc gccattctc cgccccatgg ctgactaatt tttttattt atgcagaggc 1620
 cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct 1680
 aggtcttttc aaaaagctcc cggg 1704

<210> 14
 <211> 1120

ES 2 675 847 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos del péptido señal y de la región Fc de la cadena de IgG1 humana

<400> 14

10

```

tgctagcgcc accatgaaac acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcag ctcccagatg      60
ggtgctgagc caggtgcaat tgtgcaggcg gttagctcag cctccaccaa gggcccaagc      120
gtcttcccc tggcacccctc ctccaagagc acctctggcg gcacagccgc cctgggctgc      180
ctggtcaagc actacttccc cgaaccctgt accgtgagct ggaactcagg cgccctgacc      240
agcggcgtgc acaccttccc cgctgtcctg cagtctcag gactctactc cctcagcagc      300
gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac      360
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac      420
acatgcccac cctgcccagc acctgaactc ctggggggac 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
aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg ccagccccgg      780
gaaccacagc tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc      840
ctgacctgcc tgggtcaaag cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat      900
ggccagcccg agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc      960
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcagggcaa cgtcttctca     1020
tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacc agaagagcct ctccctgtct     1080
cccggcaaat gagatatcgg gcccgtttaa acgggtggca                               1120

```

<210> 15
<211> 717
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de la quimera B273

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(717)

25 <400> 15

ES 2 675 847 T3

atg	gtg	ctg	cag	acc	cag	gtg	ttc	atc	tcc	ctg	ctg	ctg	tgg	atc	tcc	48
Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	
1			5						10					15		
ggc	gca	tat	ggc	gat	gtt	gtg	atg	acc	caa	act	cca	ctc	tcc	ctg	cct	96
Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	
			20					25						30		
gtc	agt	ctt	gga	gat	caa	gcc	tcc	atc	tct	tgc	aga	tct	agt	cag	agc	144
Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	
			35				40						45			
ctt	gta	cac	agt	aat	gga	aac	acc	tat	cta	cat	tgg	tac	ctg	cag	aag	192
Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	
	50					55					60					
cca	ggc	cag	tct	cca	aag	ctc	ctg	atc	tac	aaa	gtt	tcc	aac	cga	ttt	240
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	
65					70					75					80	
tct	ggg	gtc	cca	gac	agg	ttc	agt	ggc	agt	gga	tca	ggg	aca	gat	ttc	288
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
				85					90					95		
aca	ctc	aag	atc	agc	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	ctg	gga	att	tat	ttc	336
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Phe	
			100					105					110			
tgc	tct	caa	agt	aca	cat	gtt	ccg	tgg	acg	ttc	ggt	gga	ggc	acc	aag	384
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	
		115					120					125				
ctg	gaa	atc	aaa	cgt	acg	gtg	gcc	gcc	ccc	tcc	gtg	ttc	atc	ttc	ccc	432
Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	
	130					135					140					
ccc	tcc	gac	gag	cag	ctg	aag	tcc	ggc	acc	gcc	tcc	gtg	gtg	tgc	ctg	480
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	
145					150					155					160	
ctg	aat	aac	ttc	tac	ccc	aga	gag	gcc	aag	gtg	cag	tgg	aag	gtg	gac	528
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	
				165					170					175		
aac	gcc	ctg	cag	tcc	ggg	aac	tcc	cag	gag	agc	gtg	acc	gag	cag	gac	576
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	
			180					185					190			
agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctg	agc	agc	acc	ctg	acc	ctg	agc	aaa	624
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	
		195					200					205				
gcc	gac	tac	gag	aag	cac	aag	gtg	tac	gcc	tgc	gag	gtg	acc	cac	cag	672
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	
	210					215					220					
ggc	ctg	agc	tcc	ccc	gtc	acc	aag	agc	ttc	aac	agg	ggg	gag	tgt		717
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235						

ES 2 675 847 T3

<211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 16

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

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

Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

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

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

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

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

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

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

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

10

ES 2 675 847 T3

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

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

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

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

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

5 <210> 17
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador B273LF

<400> 17
 aaacatatgg cgatgtgtg atgacccaaa ctccacttc c 41

15 <210> 18
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador B273LR

<400> 18
 aaacgtacgt ttgattcca gcttggtgcc tccaccgaac g 41

25 <210> 19
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de la quimera B273

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 19

40 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

ES 2 675 847 T3

gtg ctg agc gag gtt cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
20 25 30	
cct ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttt	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
att ggc tac ttt atg aac tgg atg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga cgt ttt aat cca tac aat ggt gat act ttc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tct acc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr	
85 90 95	
aca gcc cac atg gag ctc ctg agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc	336
Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
100 105 110	
tat ttt tgt gga aga tcg gcg tat tac ttc gat agt ggg ggc tac ttt	384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	
gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	
210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	
225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	

ES 2 675 847 T3

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg 864
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac 912
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac 960
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

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

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

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg 1104
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag 1152
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

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

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

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

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 20
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 20

ES 2 675 847 T3

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 Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

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

Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
115 120 125

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

ES 2 675 847 T3

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
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 21
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 675 847 T3

<223> Cebador B273HF

<400> 21

aaagctgagc gaggttcagc tgcagcagtc tggacctgag c 41

5

<210> 22

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador B273HR

<400> 22

15

aaagctgagc tgactgtgag agtggtgctt tggccccagt ag 42

<210> 23

<211> 130

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro
1 5 10 15

Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His
20 25 30

His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln
35 40 45

Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr
50 55 60

Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg
65 70 75 80

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

Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val
100 105 110

Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys
115 120 125

Glu Ser
130

25

<210> 24

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 675 847 T3

<220>
 <223> Cebador DR5 Ndefw

5 <400> 24
 gtggcatatg gctctgatca cccaacaa 28

<210> 25
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador DR5 Xhorv

15 <400> 25
 cgctcagagt gattcttgt ggacaca 27

<210> 26
 <211> 139
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> rsDR5

25 <400> 26

Met Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala
 1 5 10 15

Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly
 20 25 30

His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly
 35 40 45

Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys
 50 55 60

Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr
 65 70 75 80

Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp
 85 90 95

Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met
 100 105 110

Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His
 115 120 125

Lys Glu Ser Leu Glu His His His His His His
 130 135

30 <210> 27
 <211> 717
 <212> ADN

ES 2 675 847 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L1

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(717)

10

<400> 27

```

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1                               5                               10                               15

ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
20                               25                               30

gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca      144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35                               40                               45

ctg gtc cat agc aat ggg aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa      192
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
50                               55                               60

cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc      240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
65                               70                               75

agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc      288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85                               90                               95

act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat      336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100                              105                              110

tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa      384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
115                              120                              125

gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc      432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130                              135                              140

ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg      480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145                              150                              155

ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac      528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165                              170                              175

aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac      576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180                              185                              190

agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa      624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195                              200                              205

gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag      672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210                              215                              220

ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt      717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                              230                              235

```

<210> 28

ES 2 675 847 T3

<211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 28

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

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

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

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

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

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

10

ES 2 675 847 T3

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 29
- <211> 717
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L2
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(717)
- 15 <400> 29

ES 2 675 847 T3

atg	gtg	ctg	cag	acc	cag	gtg	ttc	atc	tcc	ctg	ctg	ctg	tgg	atc	tcc	48
Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	
1			5					10					15			
ggc	gca	tat	ggc	gac	gtc	gtc	atg	aca	cag	aca	cct	ctg	agc	ctg	ccc	96
Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	
			20					25					30			
gtg	tct	ctg	ggc	gaa	ccc	gcc	agt	att	tct	tgt	agg	tca	tct	cag	tct	144
Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	
			35				40					45				
ctg	gtg	cac	agt	aac	gga	aac	aca	tat	ctc	cat	tgg	tac	ctg	cag	aag	192
Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	
	50					55					60					
cca	ggt	cag	tcc	cca	aag	ctc	ctg	atc	tat	aag	gtg	agc	aac	aga	ttc	240
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	
65					70					75					80	
tcc	gga	gtg	cct	gat	cga	ttc	agc	ggg	agt	ggt	tca	ggg	acc	gac	ttc	288
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
				85				90						95		
acc	ttg	aag	att	agc	cgg	gtc	gag	gcc	gag	gat	gtt	gga	gtg	tat	ttc	336
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	
			100					105					110			
tgt	agc	cag	agt	aca	cac	gtg	ccc	tgg	acc	ttc	gga	cct	ggg	act	aaa	384
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	
		115					120					125				
gtc	gag	att	aaa	cgt	acg	gtg	gcc	gcc	ccc	tcc	gtg	ttc	atc	ttc	ccc	432
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	
	130					135					140					
ccc	tcc	gac	gag	cag	ctg	aag	tcc	ggc	acc	gcc	tcc	gtg	gtg	tgc	ctg	480
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	
145					150					155					160	
ctg	aat	aac	ttc	tac	ccc	aga	gag	gcc	aag	gtg	cag	tgg	aag	gtg	gac	528
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	
			165						170					175		
aac	gcc	ctg	cag	tcc	ggg	aac	tcc	cag	gag	agc	gtg	acc	gag	cag	gac	576
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	
			180					185					190			
agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctg	agc	agc	acc	ctg	acc	ctg	agc	aaa	624
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	
		195					200					205				
gcc	gac	tac	gag	aag	cac	aag	gtg	tac	gcc	tgc	gag	gtg	acc	cac	cag	672
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	
	210					215					220					
ggc	ctg	agc	tcc	ccc	gtc	acc	aag	agc	ttc	aac	agg	ggg	gag	tgt		717
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235						

ES 2 675 847 T3

<211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 30

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

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

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

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

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

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

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

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31

10

ES 2 675 847 T3

<211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L3

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(717)

<400> 31

```

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1          5          10          15

ggc gca tat ggc gac gtg gtg atg acg cag act ccg ctg tca ctg ccc      96

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

gta tct ctg gga gag cct gcc agc atc agc tgc agg agc tct caa tca      144
Val Ser Leu Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35          40          45

ctg gtg cac tct aac ggt aat acc tac ctc cac tgg tat ctc cag aag      192
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
50          55          60

cca gga caa tcc cca aag ttg ctc ata tat aaa gtg tcc aac cgg ttc      240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
65          70          75

tca gga gtc cct gac cgg ttt agc ggt agt ggc tct ggt aca gat ttc      288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85          90          95

acc ctg aaa ata tca agg gtt gaa gcg gaa gac gta gga gtg tat ttt      336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
100         105         110

tgc agc cag agc acc cat gtc ccc tgg aca ttt ggg ggc ggc acc aag      384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115         120         125

gtc gaa atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc      432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130         135         140

ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg      480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145         150         155

ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac      528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165         170         175

aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac      576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180         185         190

agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa      624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195         200         205

gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag      672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210         215         220

ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt      717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225         230         235
    
```

ES 2 675 847 T3

<210> 32
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 32

10

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1                               10                               15

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

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

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

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65                               70                               75                               80

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

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

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
      115                               120                               125

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33

ES 2 675 847 T3

<211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H1

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 33

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

ES 2 675 847 T3

Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		
		195					200					205					
gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc		672
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys		
	210					215					220						
aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag		720
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu		
225					230					235					240		
ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccc	tgc	cca	gca	cct		768
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
				245					250					255			
gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccc	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag		816
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
			260					265						270			
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg		864
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
		275					280						285				
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac		912
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
	290					295						300					
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	cgg	gag	gag	cag	tac		960
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
305					310						315				320		
aac	agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac		1008
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
				325						330				335			
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc		1056
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
			340					345						350			
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg		1104
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
		355					360						365				
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag		1152
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
	370					375							380				
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac		1200
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
385					390						395				400		
atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag		1248
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
				405					410					415			
acc	acc	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc		1296
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		
			420					425					430				
aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtc	ttc	tca		1344
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
		435					440						445				

ES 2 675 847 T3

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

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 34
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 34

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

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val 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 Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly 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

ES 2 675 847 T3

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
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

ES 2 675 847 T3

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

<210> 35
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2

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

<400> 35

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

ES 2 675 847 T3

aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	
210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	
225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
290 295 300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac	960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
305 310 315 320	
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
325 330 335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
340 345 350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg	1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
355 360 365	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag	1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
370 375 380	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac	1200
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
385 390 395 400	

ES 2 675 847 T3

```

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag      1248
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                               405                               410                               415

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

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

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

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa                                          1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                               470

```

5 <210> 36
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 36

```

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

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
50                               55                               60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65                               70                               75                               80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
115                              120                              125

```

ES 2 675 847 T3

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
 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

ES 2 675 847 T3

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

<210> 37
<211> 1413
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H3

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

<400> 37

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtg ctg agc gaa gtg cag ctc gtg caa agc ggc gct gaa gtg aaa aaa	96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cca gga gcc tca gtc aaa gtg tcc tgt aag gcc tcc ggg tat agc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
atc ggc tat ttt atg aac tgg atg aag cag agc ccg ggc aaa agc ctc	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu	
50 55 60	
gaa tgg atc ggg aga ttc aat cca tac aat ggt gac acc ttt tac aat	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aaa ttc aaa ggc aag gcc acg ctg act gta gac aaa tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	

ES 2 675 847 T3

aca gcc cac atg gaa ttg tct tcc ctg agg tct gag gat acc gcg gtg	336
Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tac ttt tgt ggc cga agt gcg tat tat ttc gat tca ggc ggg tac ttc	384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	
gat tac tgg ggt cag ggg acg ctc gtc acc gta agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	
210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	
225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
290 295 300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac	960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
305 310 315 320	
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
325 330 335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	

ES 2 675 847 T3

	340		345		350		
	cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg						1104
	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg						
	355		360		365		
	gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag						1152
	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys						
	370		375		380		
	aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac						1200
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp						
	385		390		395		400
	atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag						1248
	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys						
	405		410		415		
	acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc						1296
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser						
	420		425		430		
	aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca						1344
	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser						
	435		440		445		
	tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc						1392
	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser						
	450		455		460		
	ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa						1413
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys						
	465		470				

<210> 38
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 38

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	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
		35					40					45			
Ile	Gly	Tyr	Phe	Met	Asn	Trp	Met	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Ser	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Phe	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn
65					70					75					80

ES 2 675 847 T3

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

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

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly 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
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

ES 2 675 847 T3

	35		40		45		
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg cgg cag gcc cct ggc atg gga ctg							192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu							
50			55		60		
gaa tgg atg ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac							240
Glu Trp Met Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn			70		75		80
65							
cag aaa ttc aag ggc aga gtg acc ctg acc gtg gac aag agc acc agc							288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser			85		90		95
acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg							336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val			100		105		110
tat ttc tgc ggc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc							384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe			115		120		125
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc							432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr			130		135		140
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct							480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser			145		150		155
							160
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa							528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu			165		170		175
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac							576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			180		185		190
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc							624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			195		200		205
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc							672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			210		215		220
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag							720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu			225		230		235
							240
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct							768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			245		250		255
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag							816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			260		265		270
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg							864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			275		280		285
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac							912

ES 2 675 847 T3

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

<210> 40
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 40

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

ES 2 675 847 T3

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

- <210> 41
- <211> 1413
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-1
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1413)
- 15 <400> 41

ES 2 675 847 T3

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

ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
290 295 300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac	960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
305 310 315 320	
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
325 330 335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
340 345 350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg	1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
355 360 365	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag	1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
370 375 380	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac	1200
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
385 390 395 400	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag	1248
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
405 410 415	
acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc	1296
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
420 425 430	
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca	1344
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	
435 440 445	
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc	1392
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
450 455 460	
ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa	1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
465 470	

ES 2 675 847 T3

<211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 42

```

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

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
50          55          60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65          70          75          80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly 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
210         215         220
    
```

10

ES 2 675 847 T3

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

ES 2 675 847 T3

<210> 43
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-2

10

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

<400> 43

```

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1          5          10
gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa      96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20          25          30
cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
          35          40          45
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg      192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
          50          55          60
gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac      240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65          70          75          80
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc      288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
          85          90          95
acc gcc cac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg      336
Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110
tac ttc tgc gcc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
          115          120          125
gac tac tgg ggc cag gcc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc      432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
          130          135          140
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct      480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145          150          155          160
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa      528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
          165          170          175
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac      576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
          180          185          190
    
```

15

ES 2 675 847 T3

acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	
210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	
225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
290 295 300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac	960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
305 310 315 320	
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
325 330 335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
340 345 350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg	1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
355 360 365	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag	1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
370 375 380	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac	1200
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
385 390 395 400	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag	1248
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
405 410 415	
acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc	1296
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Ser Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
420 425 430	
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca	1344
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	

ES 2 675 847 T3

```

          435                440                445
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc      1392
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
    450                455                460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa      1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    465                470

```

- <210> 44
- <211> 471
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Construcción sintética

- <400> 44

```

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

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
    50                    55                    60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65                    70                    75                    80

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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly 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

```

ES 2 675 847 T3

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
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

ES 2 675 847 T3

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> 45
- <211> 1413
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-3

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

- 15 <400> 45

```

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1              5              10              15

gtg ctg agc gag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                20              25              30

cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
                35              40              45

atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg      192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
                50              55              60

gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac      240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65              70              75              80

cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc      288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
                85              90              95

acc gcc cac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg      336
Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
                100             105             110

tac ttc tgc gcc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Thr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
                115             120             125

gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc      432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

```

ES 2 675 847 T3

130		135		140		
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct						480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser						
145		150		155		160
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa						528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu						
		165		170		175
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac						576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His						
		180		185		190
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc						624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser						
		195		200		205
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc						672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys						
		210		215		220
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag						720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu						
		225		230		235
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct						768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro						
		245		250		255
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag						816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys						
		260		265		270
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg						864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val						
		275		280		285
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac						912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp						
		290		295		300
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac						960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr						
		305		310		315
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac						1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp						
		325		330		335
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc						1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu						
		340		345		350
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg						1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg						
		355		360		365
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag						1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys						
		370		375		380
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac						1200

ES 2 675 847 T3

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

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

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

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

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

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 46
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 46

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

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe

ES 2 675 847 T3

	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
	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			

ES 2 675 847 T3

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 47
<211> 1413
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-4

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

15 <400> 47

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa 96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg 192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
50 55 60

gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac 240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc 288

ES 2 675 847 T3

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

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg 1104
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag 1152
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

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

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

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

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 48
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 48

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

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60

ES 2 675 847 T3

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly 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
 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

ES 2 675 847 T3

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 49
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-5

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

<400> 49

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa 96
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

ES 2 675 847 T3

cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc aag agc ctg	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu	
50 55 60	
gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tac ttc tgc ggc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc	384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	
gac tac tgg ggc cag gcc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg gcc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	
210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	
225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	

ES 2 675 847 T3

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac 912
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac 960
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

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

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

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg 1104
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag 1152
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

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

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

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

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 50
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 50

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

ES 2 675 847 T3

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

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

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly 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
 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

ES 2 675 847 T3

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
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

- 5 <210> 51
- <211> 717
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L1-NE
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(717)
- 15 <400> 51

ES 2 675 847 T3

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct	96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
20 25 30	
gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca	144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctg gtc cat agc aat gag aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa	192
Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
50 55 60	
cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc	240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
65 70 75 80	
agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
85 90 95	
act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
100 105 110	
tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	
115 120 125	
gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
130 135 140	
ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
145 150 155 160	
ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
165 170 175	
aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
180 185 190	
agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
195 200 205	
gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag	672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
210 215 220	
ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt	717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	

225

230

235

ES 2 675 847 T3

<211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 52

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

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

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

Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

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

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

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

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

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

10

ES 2 675 847 T3

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

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

5 <210> 53
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador L-F1

<400> 53
 aggtaagctt gctagcgcca ccatggtgct gc 32

15 <210> 54
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador L-NE-R2

<400> 54
 ccaatgcagg taagtgttct cattgctatg gaccagtgc tg 42

25 <210> 55
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador L-NE-F2

<400> 55
 cagtcactgg tccatagcaa tgagaacct tacctgcatt gg 42

35 <210> 56
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador L-R1

45 <400> 56
 ggatgccacc cgtttaaacg ggcccctaac ac 32

50 <210> 57
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L1-NF

55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(717)

ES 2 675 847 T3

<400> 57

atg	gtg	ctg	cag	acc	cag	gtg	ttc	atc	tcc	ctg	ctg	ctg	tgg	atc	tcc	48
Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	
1			5						10					15		
ggc	gca	tat	ggc	gac	atc	gta	atg	acc	cag	tct	ccg	ctg	agt	ctt	cct	96
Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	
			20						25					30		
gtg	act	cca	ggg	gag	ccc	gca	agc	atc	tct	tgt	cgc	agc	agt	cag	tca	144
Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	
		35					40						45			
ctg	gtc	cat	agc	aat	ttc	aac	act	tac	ctg	cat	tgg	tac	ctc	caa	aaa	192
Leu	Val	His	Ser	Asn	Phe	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	
	50					55					60					
cca	ggg	cag	tcc	cca	cag	ctc	ttg	atc	tac	aag	gtg	tcc	aat	cgg	ttc	240
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	
65					70					75					80	
agt	ggt	gtg	cct	gac	cgc	ttc	tcc	gga	agt	ggc	tcc	ggg	aca	gat	ttc	288
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
				85					90					95		
act	ctt	aag	att	tca	aga	gtg	gag	gca	gaa	gac	gtt	gga	gtc	tat	tat	336
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	
			100					105					110			
tgc	tca	cag	agc	aca	cat	gtc	ccc	tgg	act	ttc	ggt	ccc	ggc	aca	aaa	384
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	
		115					120					125				
gtc	gag	atc	aag	cgt	acg	gtg	gcc	gcc	ccc	tcc	gtg	ttc	atc	ttc	ccc	432
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	
	130					135					140					
ccc	tcc	gac	gag	cag	ctg	aag	tcc	ggc	acc	gcc	tcc	gtg	gtg	tgc	ctg	480
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Val	Cys	Leu
145					150					155						160
ctg	aat	aac	ttc	tac	ccc	aga	gag	gcc	aag	gtg	cag	tgg	aag	gtg	gac	528
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	
				165					170					175		
aac	gcc	ctg	cag	tcc	ggg	aac	tcc	cag	gag	agc	gtg	acc	gag	cag	gac	576
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	
			180					185					190			
agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctg	agc	agc	acc	ctg	acc	ctg	agc	aaa	624
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	
		195					200					205				
gcc	gac	tac	gag	aag	cac	aag	gtg	tac	gcc	tgc	gag	gtg	acc	cac	cag	672
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	
			210				215					220				
ggc	ctg	agc	tcc	ccc	gtc	acc	aag	agc	ttc	aac	agg	ggg	gag	tgt		717
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235						

ES 2 675 847 T3

<210> 58
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 58

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1                               10                          15

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

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

Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50                               55                          60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65                               70                          75                          80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100                              105                          110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115                              120                          125

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 847 T3

<210> 59
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador L-NF-R2
 <400> 59
 10 ccaatgcagg taagtgtga aattgctatg gaccagtgac tg 42
 <210> 60
 <211> 42
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador L-NF-F2
 20 <400> 60
 cagtcactgg tccatagcaa ttcaacact tacctgcatt gg 42
 <210> 61
 <211> 717
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L1-NK
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(717)
 35 <400> 61
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct 96
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30
 gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca 144
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

ES 2 675 847 T3

ctg gtc cat agc aat aag aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa 192
 Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc 288
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat 336
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa 384
 Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc 432
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg 480
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac 528
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac 576
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa 624
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag 672
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 717
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 62
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 62

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

ES 2 675 847 T3

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

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

Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

<210> 63
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5

ES 2 675 847 T3

<223> Cebador L-NK-R2

<400> 63
5 ccaatgcagg taagtattct tattactatg gaccagtac tg 42

<210> 64
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador L-NK-F2

<400> 64
15 cagtcactgg tccatagcaa taagaacact tacctgcatt gg 42

<210> 65
<211> 717
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L1-NL

25 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(717)

30 <400> 65

ES 2 675 847 T3

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct 96
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca 144
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

ctg gtc cat agc aat ctg aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa 192
 Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc 288
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat 336
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa 384
 Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc 432
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg 480
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac 528
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac 576
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa 624
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag 672
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 717
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 66

<211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 66

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

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

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

Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

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

10

ES 2 675 847 T3

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 67
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador L-NL-R2

<400> 67
 ccaatgcagg taagtgtca gattgctatg gaccagtgcac tg 42

15 <210> 68
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador L-NL-F2

<400> 68
 cagtcactgg tccatagcaa tctgaacact tacctgcatt gg 42

25 <210> 69
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 675 847 T3

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-1-NE

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1413)

5

<400> 69

atg	aaa	cac	ctg	tgg	ttc	ttc	ctc	ctg	ctg	gtg	gca	gct	ccc	aga	tgg	48
Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	
1			5					10						15		
gtg	ctg	agc	gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggc	gcc	gaa	gtg	aag	aaa	96
Val	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	
			20					25					30			
cct	gga	gcc	agc	gtg	aag	gtg	tcc	tgc	aag	gcc	agc	ggc	tac	agc	ttc	144
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	
		35					40					45				
atc	ggc	tac	ttc	atg	aac	tgg	atg	aag	cag	agc	ccc	ggc	atg	agc	ctg	192
Ile	Gly	Tyr	Phe	Met	Asn	Trp	Met	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Met	Ser	Leu	
	50					55					60					
gaa	tgg	atc	ggc	cgg	ttc	aac	ccc	tac	aac	gag	gac	acc	ttc	tac	aac	240
Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Phe	Asn	Pro	Tyr	Asn	Glu	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	
65					70				75						80	
cag	aag	ttc	aag	gga	aag	gcc	acc	ctg	aca	gtg	gac	aag	agc	acc	agc	288
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	
				85				90						95		
acc	gcc	tac	atg	gaa	ctg	agc	agc	ctg	cgg	agc	gag	gat	acc	gcc	gtg	336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
			100					105						110		
tac	ttc	tgc	gcc	aga	agc	gcc	tac	tac	ttc	gac	agc	ggc	ggc	tac	ttc	384
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Gly	Gly	Tyr	Phe	
		115					120					125				
gac	tac	tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtg	aca	gtg	agc	tca	gcc	tcc	acc	432
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	
		130				135					140					
aag	ggc	cca	agc	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	480
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	
145					150					155					160	
ggc	ggc	aca	gcc	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	528
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
				165				170						175		
ccc	gtg	acc	gtg	agc	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	576
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
			180					185					190			
acc	ttc	ccc	gct	gtc	ctg	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	624
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
		195					200					205				

10

ES 2 675 847 T3

gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	672
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
	210					215					220					
aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag	720
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	
225					230					235					240	
ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccc	tgc	cca	gca	cct	768
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				245					250					255		
gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccc	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	816
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
			260					265						270		
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	864
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
		275					280						285			
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	912
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
	290					295					300					
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	cgg	gag	gag	cag	tac	960
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
305					310					315					320	
aac	agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	1008
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
				325					330					335		
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	1056
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
			340					345						350		
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg	1104
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
		355					360					365				
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	1152
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
	370					375					380					
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	1200
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
385					390					395					400	
atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag	1248
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
				405					410					415		
acc	acc	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	1296
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
			420					425					430			
aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtc	ttc	tca	1344
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
		435					440					445				
tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acc	cag	aag	agc	1392
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	

ES 2 675 847 T3

450

455

460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

1413

5

<210> 70
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 70

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

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Glu Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly 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

ES 2 675 847 T3

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
 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

ES 2 675 847 T3

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> 71
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador H-F1

<400> 71
aggtaaagctt gctagcgcca ccatgaaaca cc 32

15 <210> 72
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador H-NE-R2

<400> 72
ctggttgtag aagggtgcct cgtttagagg gttgaaccgg cc 42

25 <210> 73
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador H-NE-F2

35 <400> 73
ggccggttca acccctacaa cgaggacacc ttctacaacc ag 42

40 <210> 74
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador H-R1

<400> 74
ggatgccacc cgtttaaacg ggcccgatat ctc 33

50 <210> 75
<211> 705
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de conatumumab

55 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(705)

ES 2 675 847 T3

<400> 75

atg	gtg	ctg	cag	acc	cag	gtg	ttc	atc	tcc	ctg	ctg	ctg	tgg	atc	tcc	48
Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	
1				5					10					15		
ggc	gca	tat	ggc	gaa	atc	gtg	ttg	aca	cag	agt	ccc	ggc	act	ctt	agc	96
Gly	Ala	Tyr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	
			20					25					30			
ctt	agc	ccg	ggt	gaa	cgc	gcc	acc	ctg	tcc	tgc	cgc	gcc	tct	cag	gga	144
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	
		35					40					45				
atc	tct	cgc	tct	tac	ctc	gcg	tgg	tac	cag	cag	aaa	ccc	ggc	cag	gcc	192
Ile	Ser	Arg	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	
	50					55					60					
ccc	agt	ttg	ctg	ata	tac	ggt	gcc	tct	agc	cga	gca	act	ggc	atc	cca	240
Pro	Ser	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	
65					70					75					80	
gac	cgg	ttc	tca	gga	tct	ggc	tcc	ggg	act	gac	ttc	act	ctg	acc	atc	288
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
				85						90				95		
tcc	aga	ctg	gag	ccc	gag	gat	ttc	gcg	gta	tat	tac	tgc	cag	cag	ttc	336
Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	
			100					105					110			
ggc	agc	agt	cct	tgg	acc	ttc	gga	cag	ggt	act	aag	gtg	gag	att	aaa	384
Gly	Ser	Ser	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
		115					120					125				
cgt	acg	gtg	gcc	gcc	ccc	tcc	gtg	ttc	atc	ttc	ccc	ccc	tcc	gac	gag	432
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
		130				135						140				
cag	ctg	aag	tcc	ggc	acc	gcc	tcc	gtg	gtg	tgc	ctg	ctg	aat	aac	ttc	480
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
145					150					155					160	
tac	ccc	aga	gag	gcc	aag	gtg	cag	tgg	aag	gtg	gac	aac	gcc	ctg	cag	528
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
				165					170					175		
tcc	ggg	aac	tcc	cag	gag	agc	gtg	acc	gag	cag	gac	agc	aag	gac	agc	576
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
			180					185						190		
acc	tac	agc	ctg	agc	agc	acc	ctg	acc	ctg	agc	aaa	gcc	gac	tac	gag	624
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
		195					200					205				
aag	cac	aag	gtg	tac	gcc	tgc	gag	gtg	acc	cac	cag	ggc	ctg	agc	tcc	672
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
	210					215					220					
ccc	gtc	acc	aag	agc	ttc	aac	agg	ggg	gag	tgt						705
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
225					230					235						

ES 2 675 847 T3

<210> 76
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 76

```

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 Gly Thr Leu Ser
20           25           30

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

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

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

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

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

Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115          120          125

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

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

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    
```

ES 2 675 847 T3

180 185 190

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

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

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

5 <210> 77
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de conatumumab

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

15 <400> 77

```

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1           5           10           15

gtg ctg agc cag gtg cag ctt cag gaa agc ggg ccc ggc ctc gtg aag      96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20           25           30

ccc tcc cag acc ctg tct ctt act tgt aca gtg agc ggt ggc agc att      144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35           40           45

tct tca ggc gat tac ttc tgg agt tgg att cgc caa ctg cct ggt aaa      192
Ser Ser Gly Asp Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys
50           55           60

ggg ctg gaa tgg atc ggg cat att cac aat tca gga acc aca tat tat      240
Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr
65           70           75

aac cct tca ctg aag agc cgg gta act atc tcc gtt gac act agc aag      288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
85           90           95

aaa cag ttc tcc ctc cgg ctg tct tct gtc aca gcc gct gac acc gct      336
Lys Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100          105          110

gtt tac tac tgt gca aga gat cgg ggt ggc gac tac tat tac ggc atg      384
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met
115          120          125

gat gtt tgg gga cag gga acc acc gta aca gtg agc tca gcc tcc acc      432
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
  
```

ES 2 675 847 T3

130	135	140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct			480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser			
145	150	155	160
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa			528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu			
	165	170	175
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac			576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			
	180	185	190
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc			624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			
	195	200	205
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc			672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
	210	215	220
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag			720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu			
	225	230	235
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct			768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
	245	250	255
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag			816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
	260	265	270
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aac ttc aac tgg tac gtg gac			864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
	275	280	285
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac			912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
	290	295	300
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac			960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
	305	310	315
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac			1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
	325	330	335
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc			1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
	340	345	350
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg			1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
	355	360	365
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag			1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys			
	370	375	380
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac			1200

ES 2 675 847 T3

```

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

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag      1248
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                               405                               410                               415

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

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

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

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa                                          1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                               470

```

5
<210> 78
<211> 471
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Construcción sintética

<400> 78

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1           5           10           15

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35           40           45

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

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

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

Lys Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100          105          110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met

```


ES 2 675 847 T3

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

5 <210> 79
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 79

10 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

15 <210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 80

20 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

25 <210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 81

30 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 82
 <211> 5
 <212> PRT

ES 2 675 847 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 82

5 Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 83

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

Gly

15

<210> 84

<211> 13

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 84

Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

25

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> CDRL1 de hB273_L1-NE

<400> 85

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

35

<210> 86

<211> 16

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRL1 de hB273_L1-NF

45

<400> 86

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

50

<210> 87

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 675 847 T3

<220>

<223> CDRL1 de hB273_L1-NK

5 <400> 87

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 88

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CDRL1 de hB273_L1-NL

<400> 88

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

20

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> CDRH2 de hB273_H2-1-NE

<400> 89

30

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

Gly

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-DR5, o un fragmento funcional del mismo, que tiene actividad de unión antigénica, **caracterizado porque** contiene:

5 (a) una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

- a1) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 34;
- a2) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 36;
- 10 a3) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 38;
- a4) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 40;
- 15 a5) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 44;
- a6) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46;
- a7) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48;
- 20 a8) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 50; y

(b) una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

- 25 b1) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28;
- b2) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30;
- b3) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 32;
- 30 b4) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52;
- b5) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58;
- 35 b6) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62;
- b7) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66.

2. El anticuerpo anti-DR5, o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** contiene: i) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 34 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 28, 30 y 32; ii) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 36 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 28, 30 y 32; iii) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 38 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 28, 30 y 32; iv) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 40 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; v) una secuencia de la región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 44 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; vi) una secuencia de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46 y una secuencia de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; vii) una secuencia de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48 y una secuencia de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos

21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; viii) una secuencia de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 50 y una secuencia de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28.

- 5 3. El fragmento funcional del anticuerpo anti-DR5, que tiene actividad de unión antigénica, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab' y Fv.
4. Una composición farmacéutica **caracterizada porque** comprende al menos uno de los anticuerpos anti-DR5, o fragmentos funcionales de los mismos, que tienen actividad de unión antigénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada por** ser una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.
- 15 6. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, **caracterizada porque** comprende (i) al menos uno de los anticuerpos anti-DR5, o fragmentos funcionales de los mismos que tienen actividad de unión antigénica, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3; (ii) y al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11 y vinblastina.
7. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de útero, melanoma, glioblastoma y cáncer de células sanguíneas.
- 20 8. Un anticuerpo anti-DR5, o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.
9. Un anticuerpo anti-DR5, o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, **caracterizado por** la administración simultánea o secuencial del anticuerpo, o fragmento funcional que tiene actividad de unión antigénica, y al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11, vinblastina y 5-FU.
- 25 10. Un producto seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11, vinblastina y 5-FU para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer **caracterizado por** la administración simultánea o secuencial de un anticuerpo, o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 11. El anticuerpo o producto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de útero, melanoma, fibrosarcoma, glioblastoma y cáncer de células sanguíneas.

35

Fig. 1

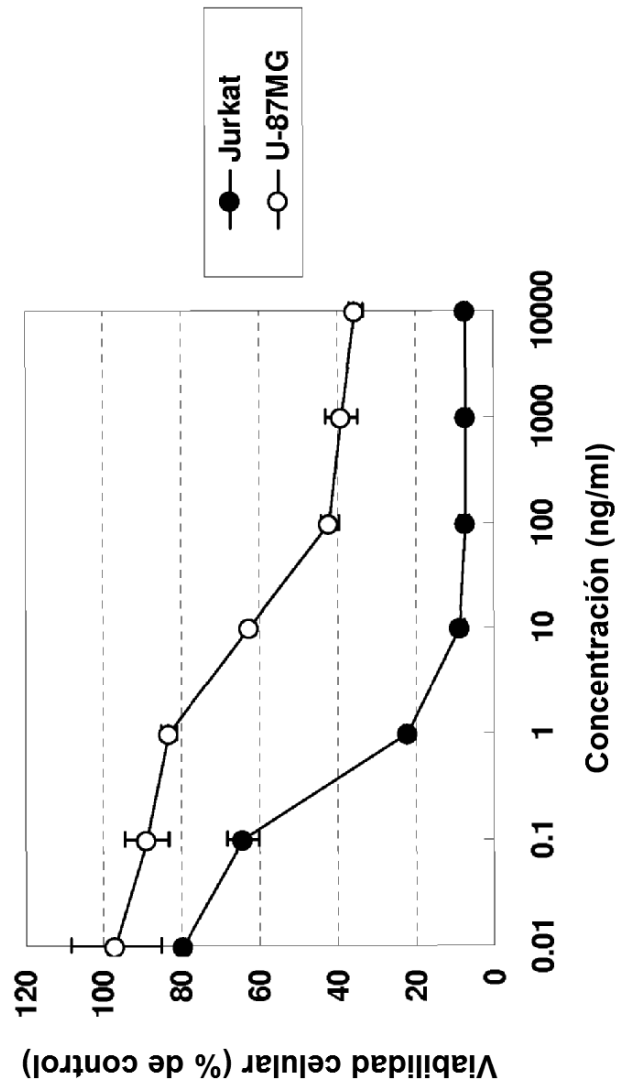
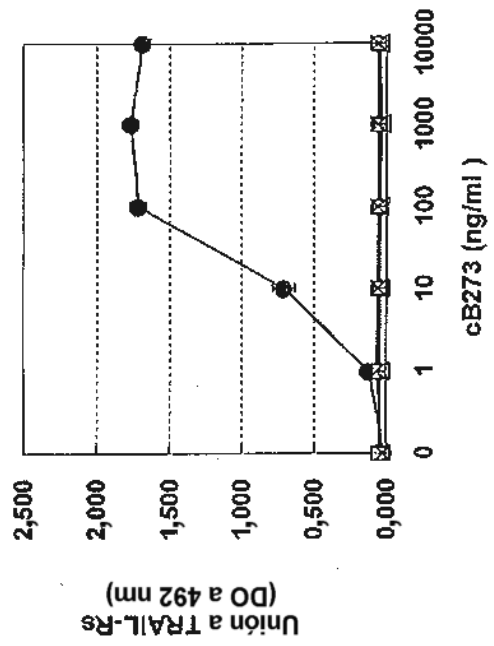


Fig. 2

A)



B)

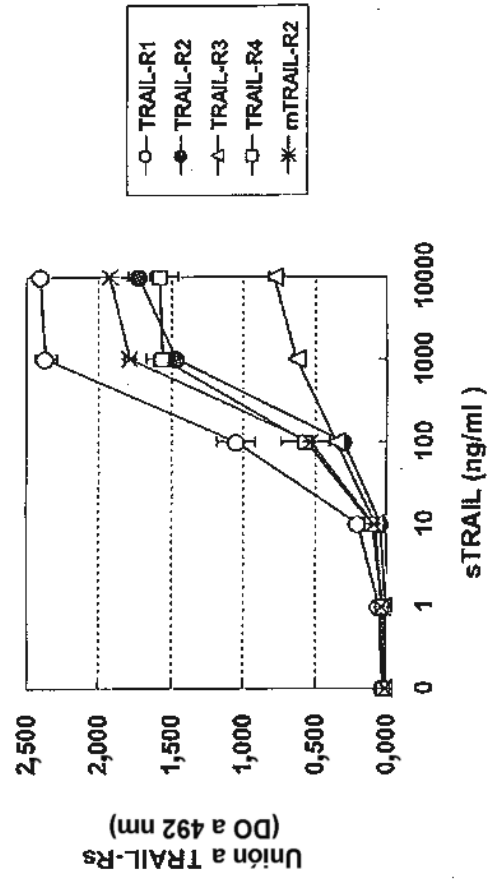
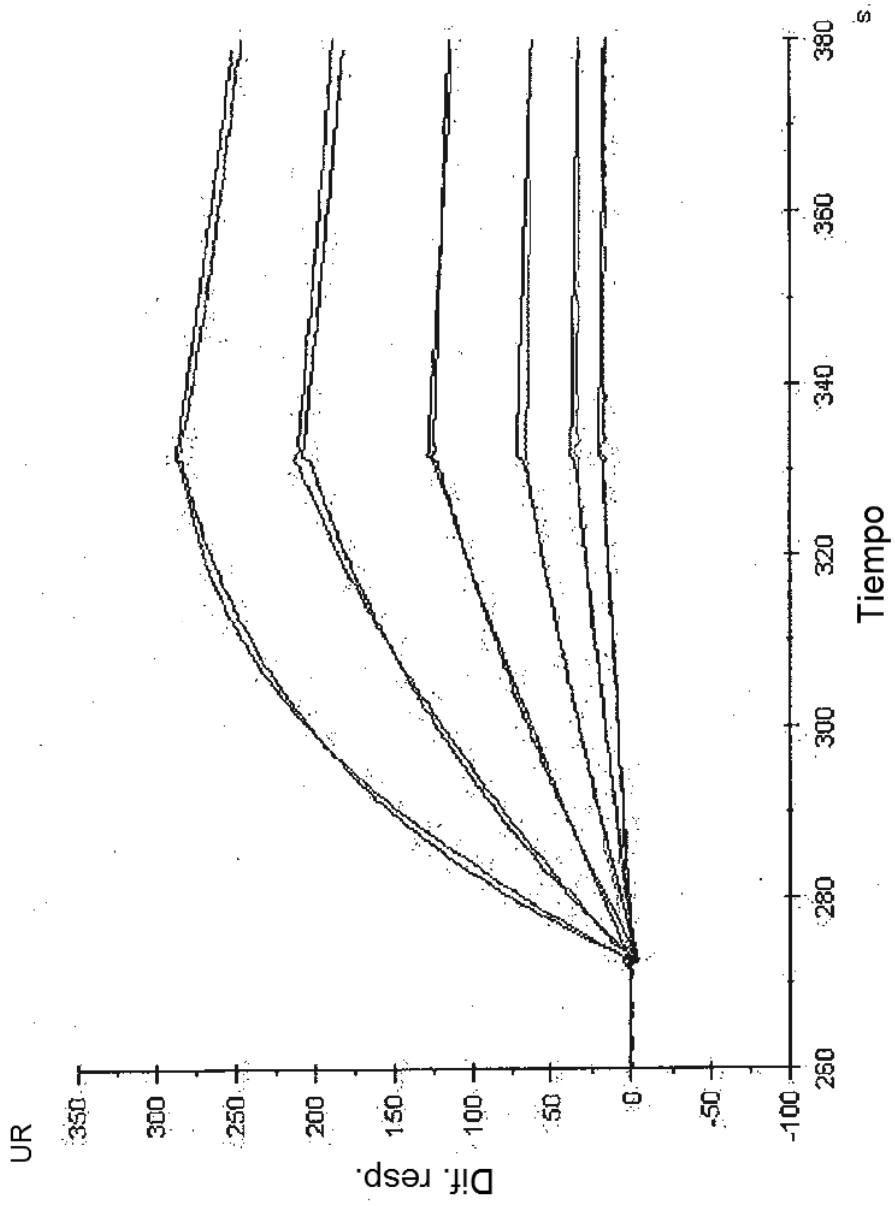


Fig. 3



Kon (1/Ms)	Koff (1/d)	KD (nM)
1,69E+06	2,79E-03	1,65

Fig. 4

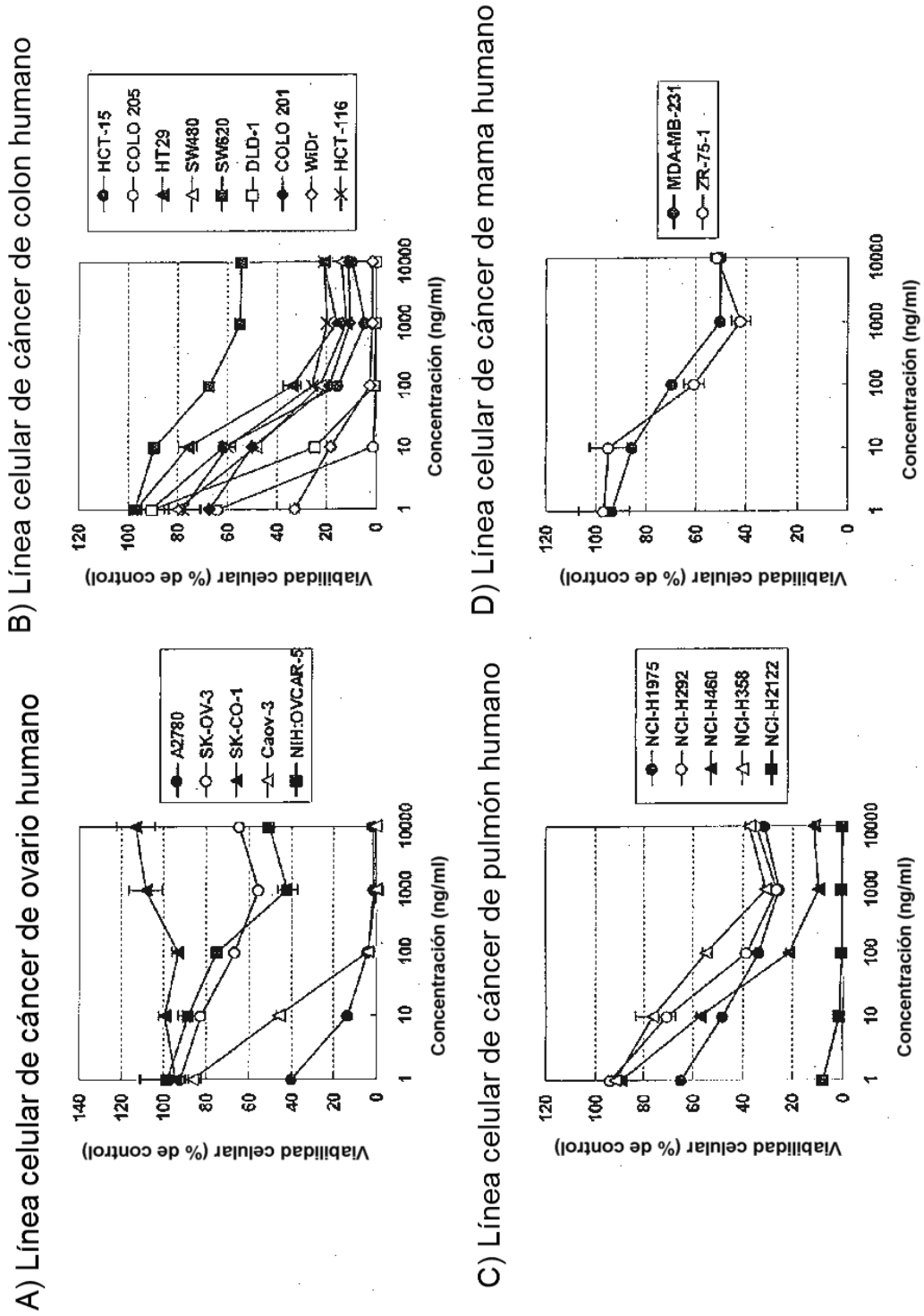
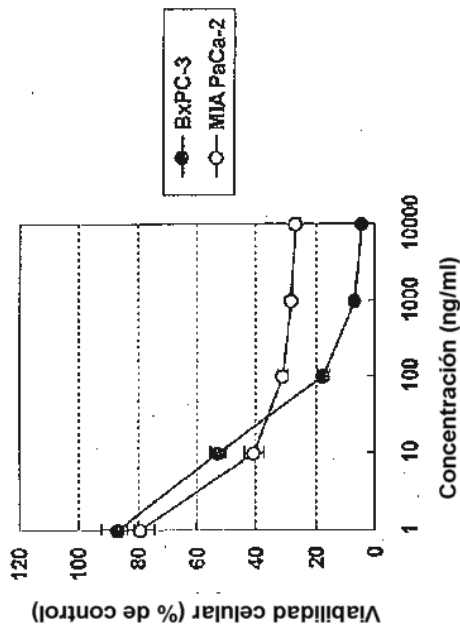
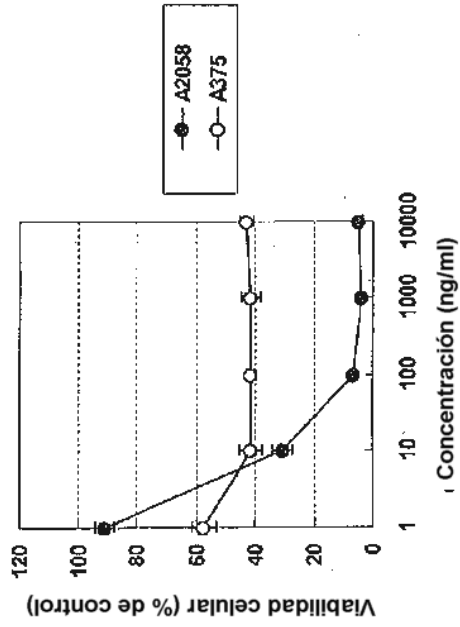


Fig. 5

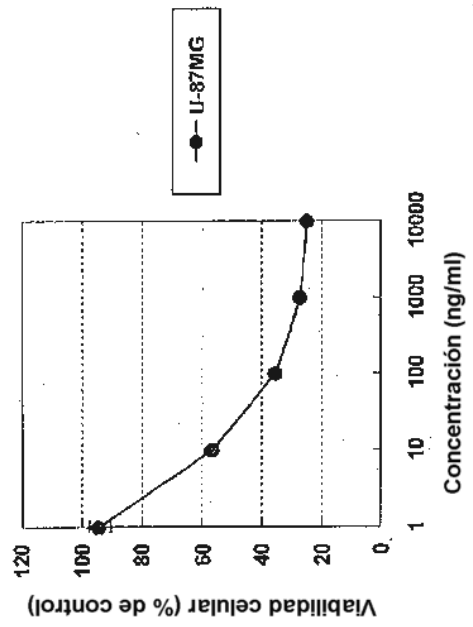
A) Línea celular de cáncer pancreático humano



B) Línea celular de melanoma humano



C) Línea celular de glioblastoma humano



D) Línea celular de cáncer endometrial humano

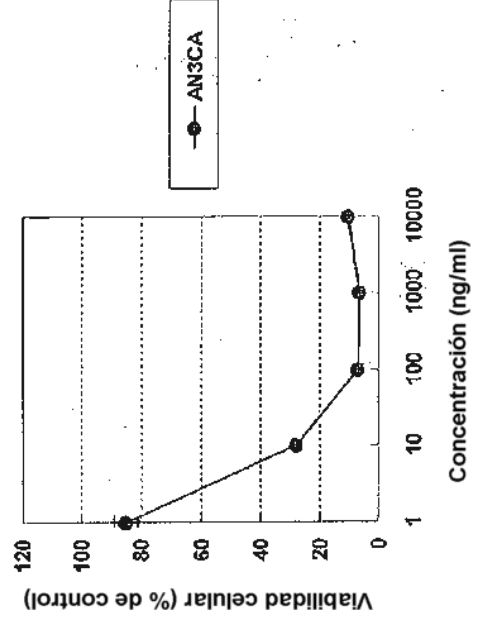


Fig. 6

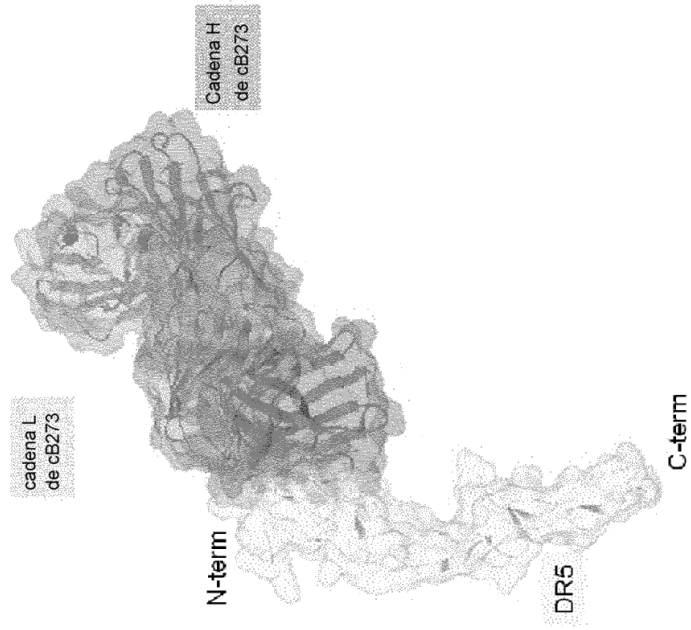
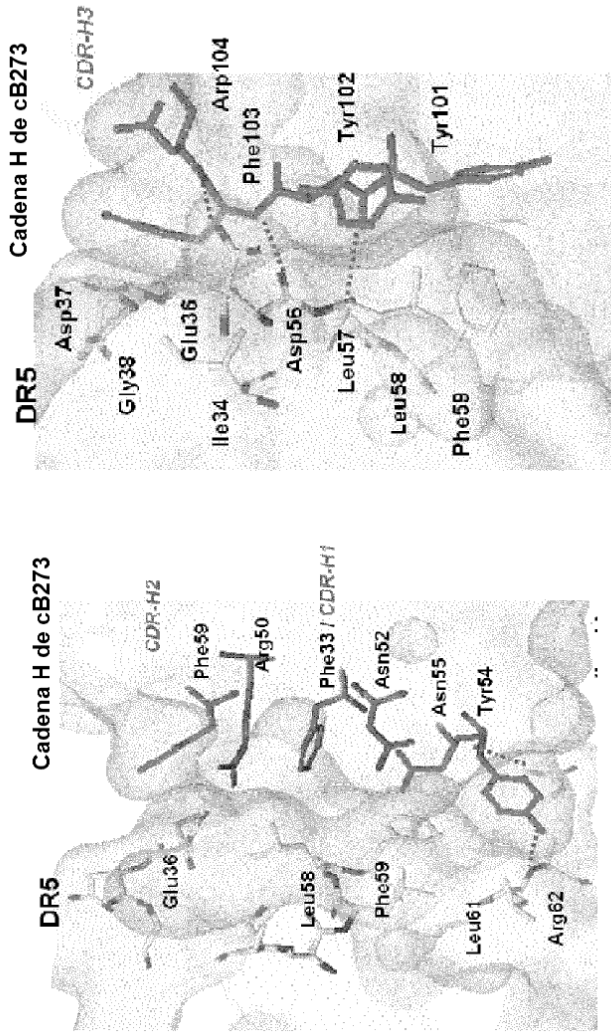


Fig. 7 A)



B)

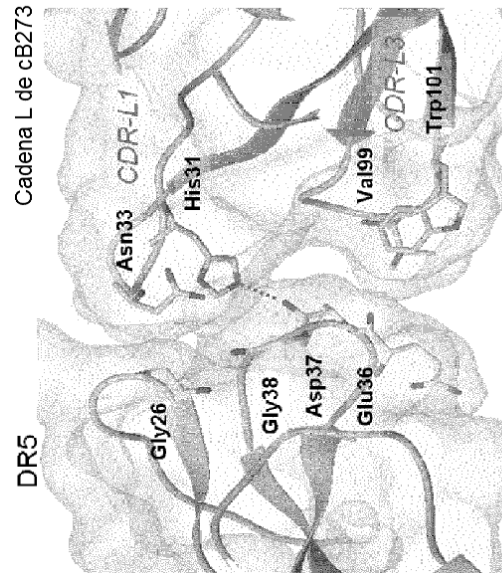


Fig. 8-1

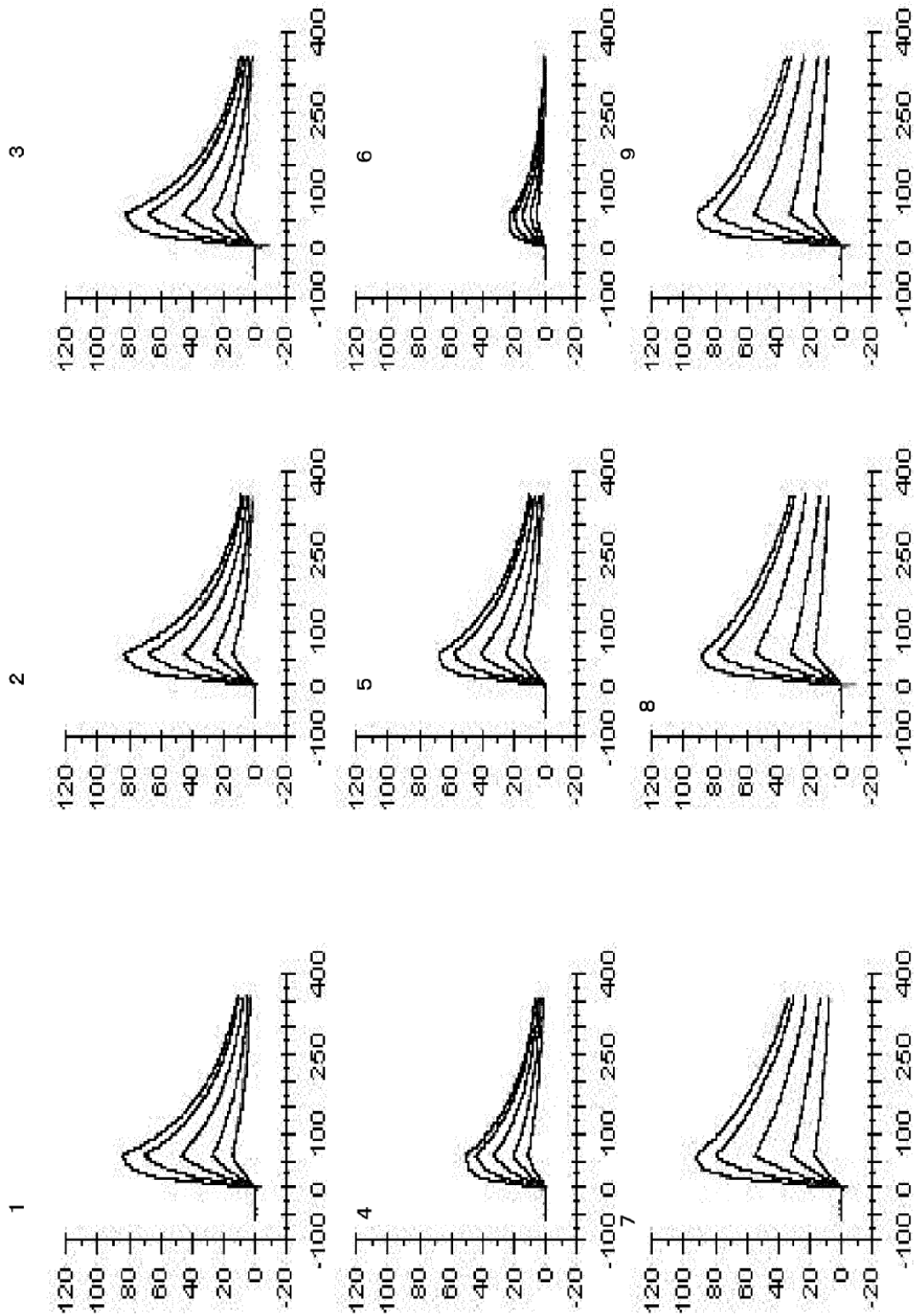


Fig. 8-2

N.º de entrada	Nombre	Kon (1/Ms)	Koff (1/d)	KD (nM)
1	hB273_H1/hB273_L1	1, 804E+06	9, 837E-03	5, 45
2	hB273_H1/hB273_L2	1, 441E+06	9, 409E-03	6, 53
3	hB273_H1/hB273_L3	1, 527E+06	9, 218E-03	6, 04
4	hB273_H2/hB273_L1	1, 853E+06	8, 087E-03	4, 36
5	hB273_H2/hB273_L2	1, 711E+06	7, 694E-03	4, 47
6	hB273_H2/hB273_L3	1, 889E+06	1, 020E-02	5, 40
7	hB273_H3/hB273_L1	1, 809E+06	4, 340E-03	2, 40
8	hB273_H3/hB273_L2	2, 117E+06	4, 645E-03	2, 19
9	hB273_H3/hB273_L3	2, 027E+06	4, 363E-03	2, 15

Fig. 9

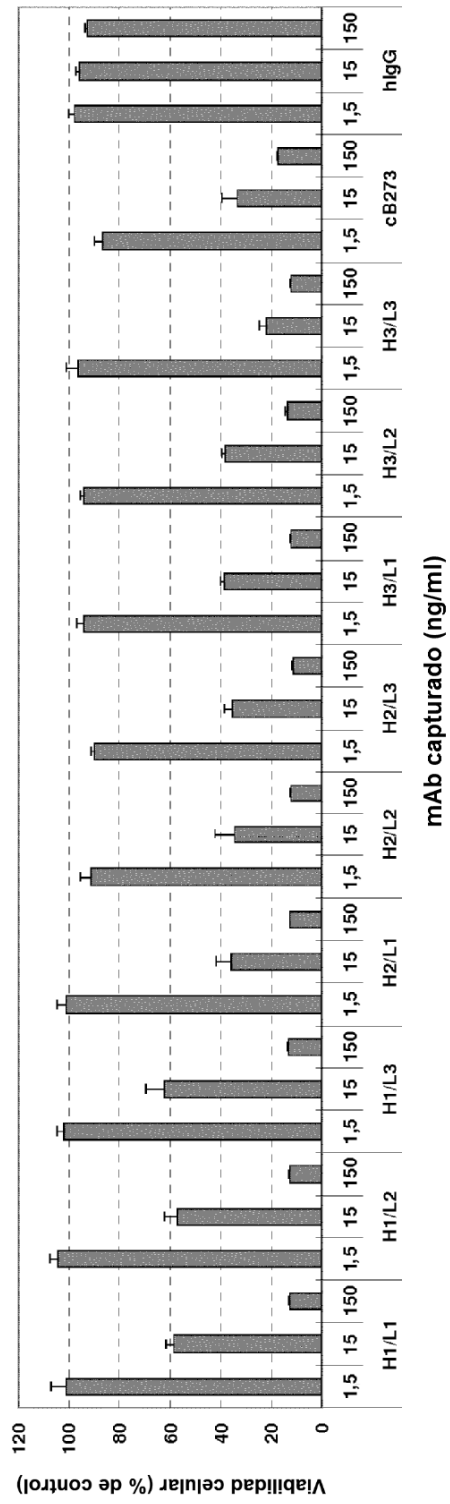


Fig. 10-1

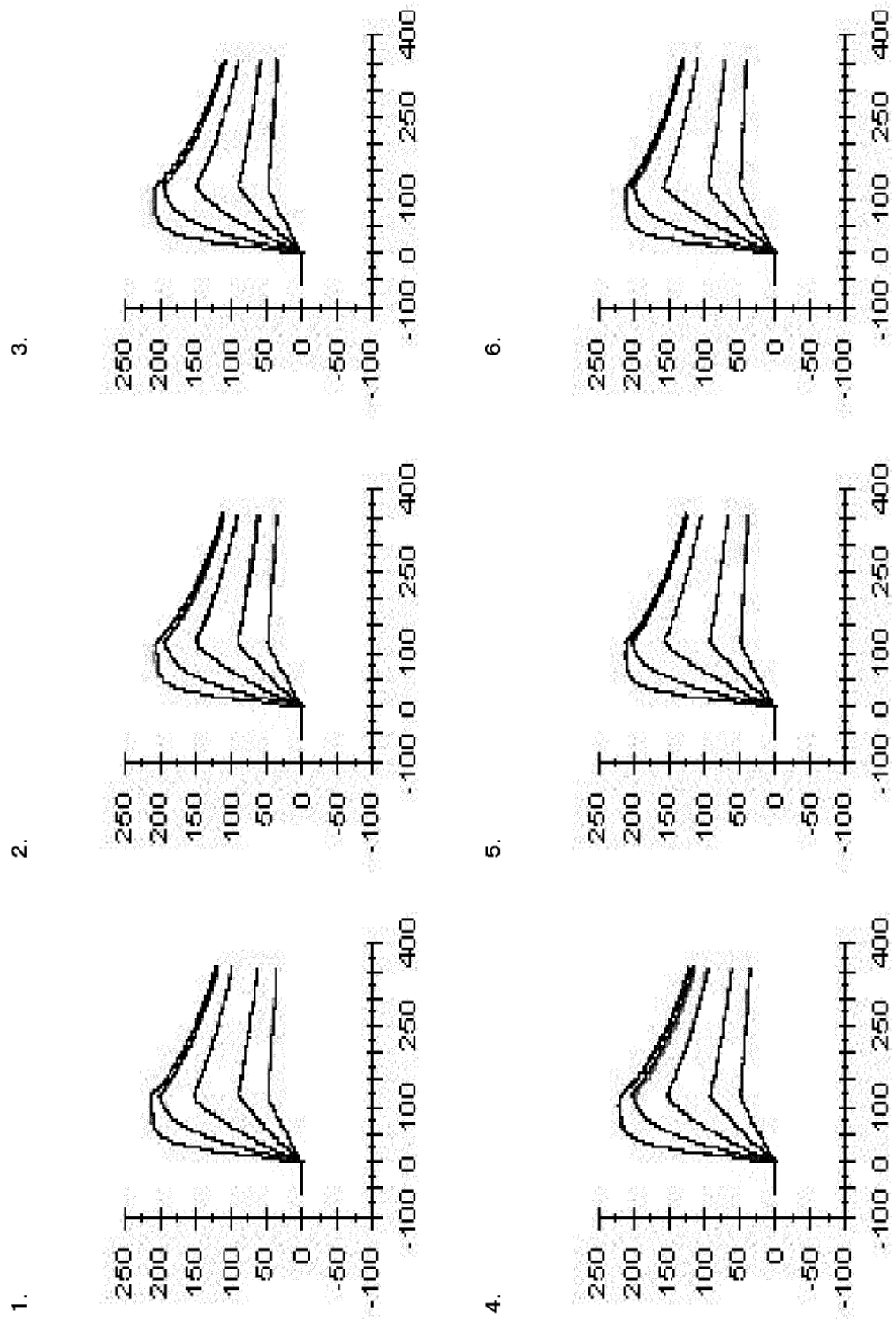


Fig. 10-2

N.º de entrada	Nombre	Kon (1/MS)	Koff (1/d)	KD (nM)
1	hB273_H1-1/hB273_L1	2,074E+06	3,787E-03	1,83
2	hB273_H2-1/hB273_L1	2,014E+06	4,015E-03	1,99
3	hB273_H2-2/hB273_L1	2,036E+06	4,359E-03	2,14
4	hB273_H2-3/hB273_L1	1,770E+06	3,755E-03	2,12
5	hB273_H2-4/hB273_L1	2,327E+06	3,595E-03	1,55
6	hB273_H2-5/hB273_L1	2,196E+06	3,024E-03	1,38

Fig. 11

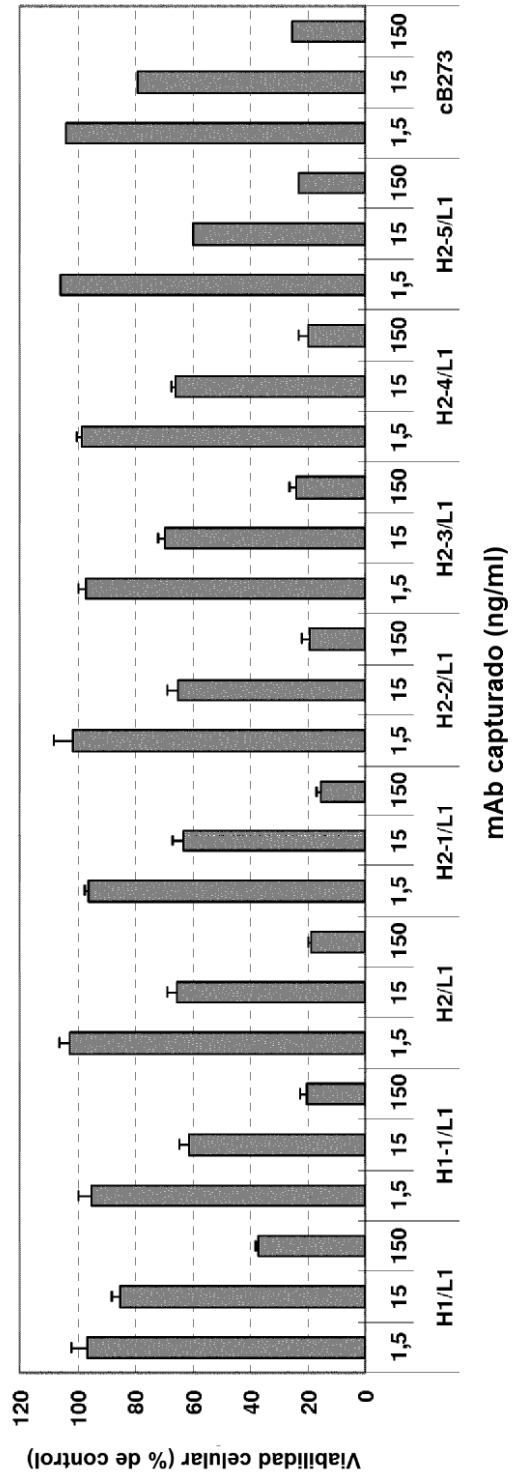


Fig. 12-1

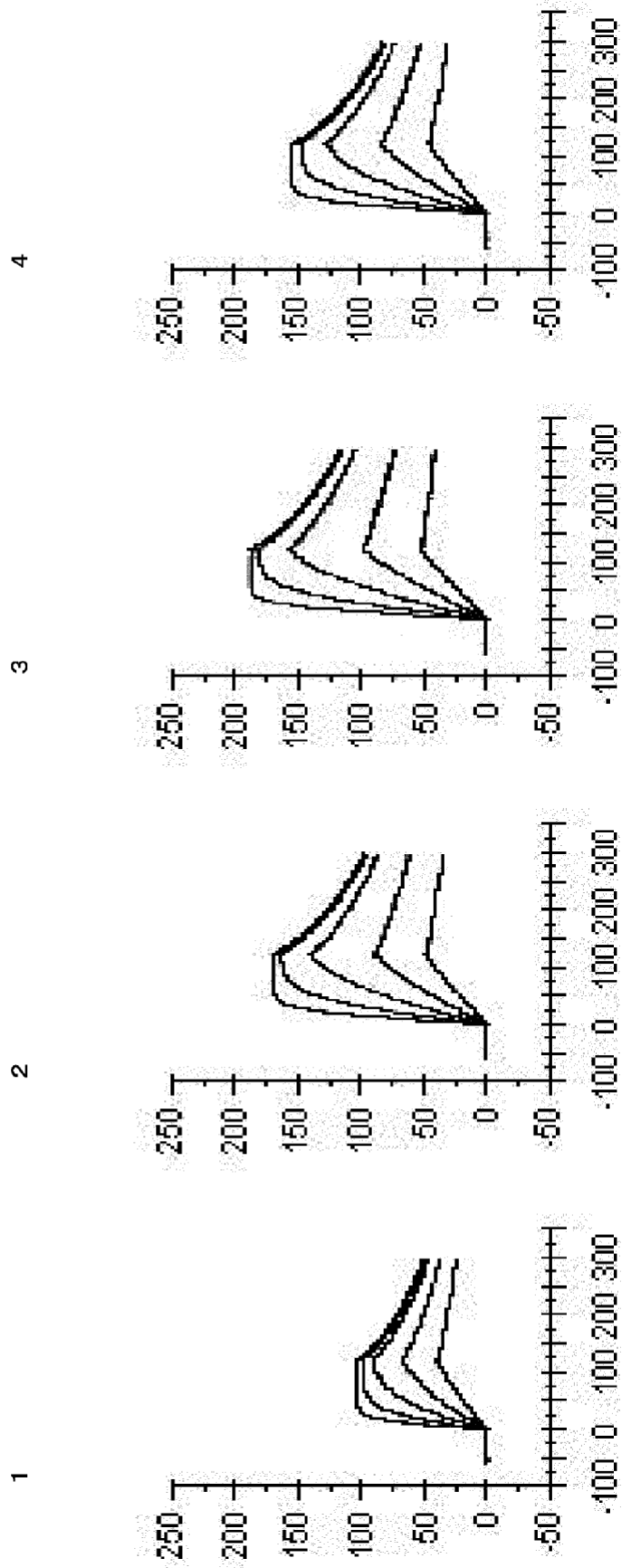


Fig. 12-2

N.º de entrada	Nombre	kon (1/Ms)	koff (1/d)	KD (nM)
1	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NE	2, 77E+06	5, 59E-03	2, 02
2	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NF	2, 92E+06	5, 14E-03	1, 76
3	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK	3, 34E+06	4, 63E-03	1, 39
4	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NL	3, 34E+06	5, 90E-03	1, 76

Fig. 13-11

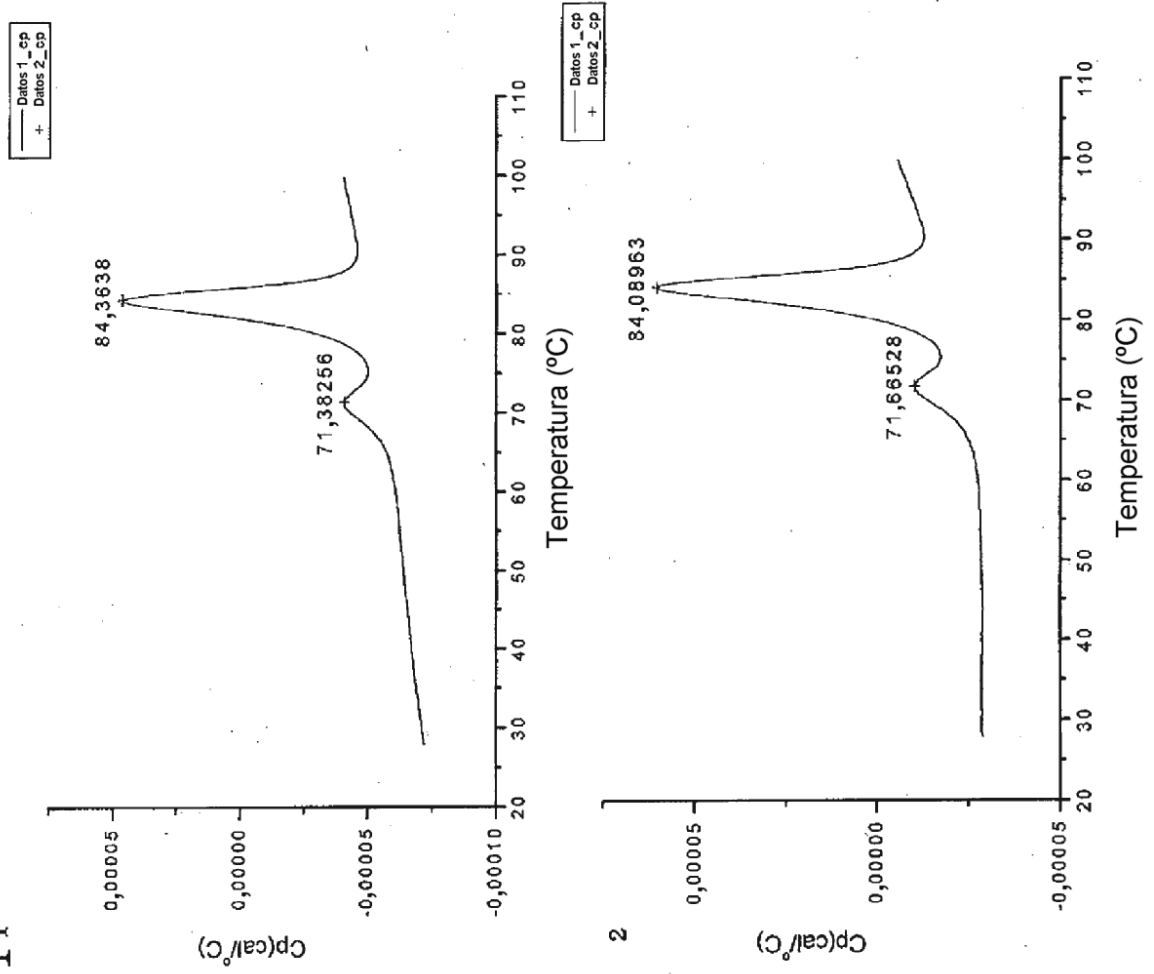


Fig. 13-2₃

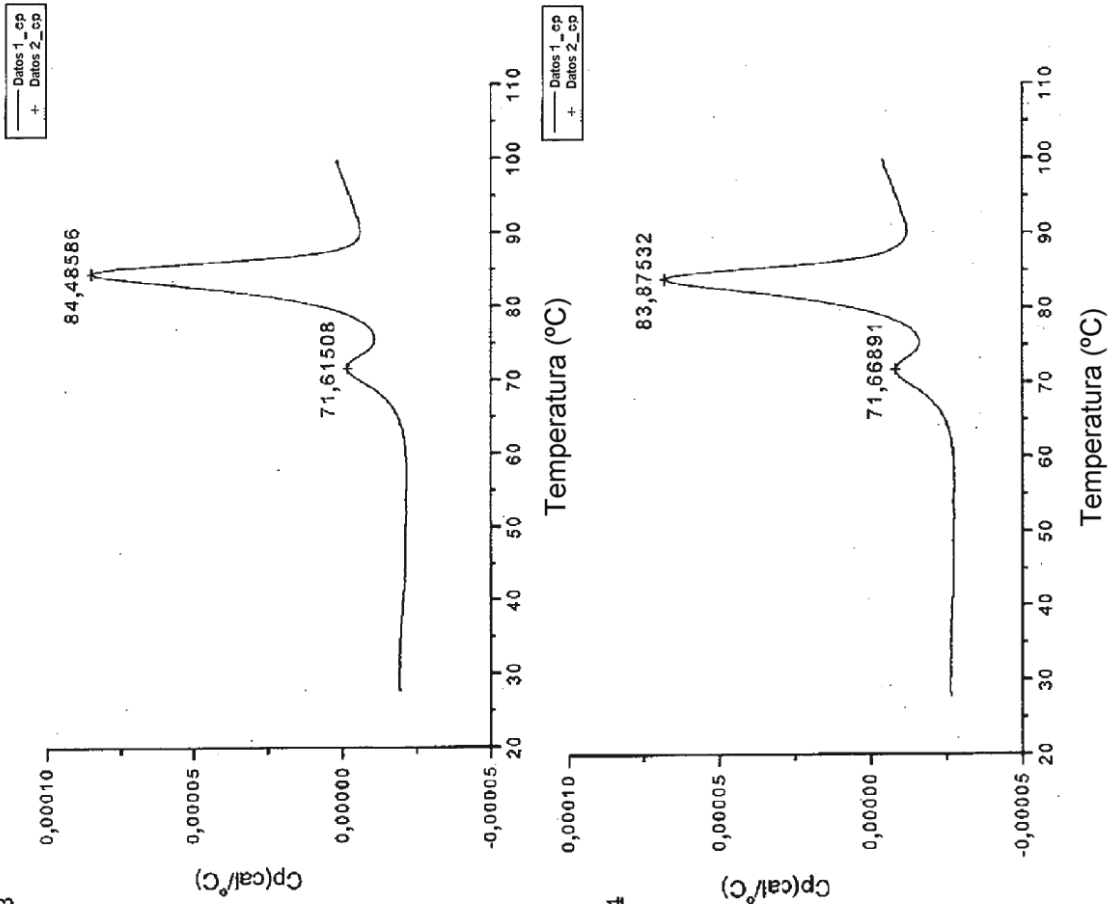


Fig. 13-3

N.º de entrada	Nombre	Tm (°C)
1	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NE	83, 9
2	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NF	84, 1
3	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK	84, 5
4	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NL	84, 4

Fig. 14

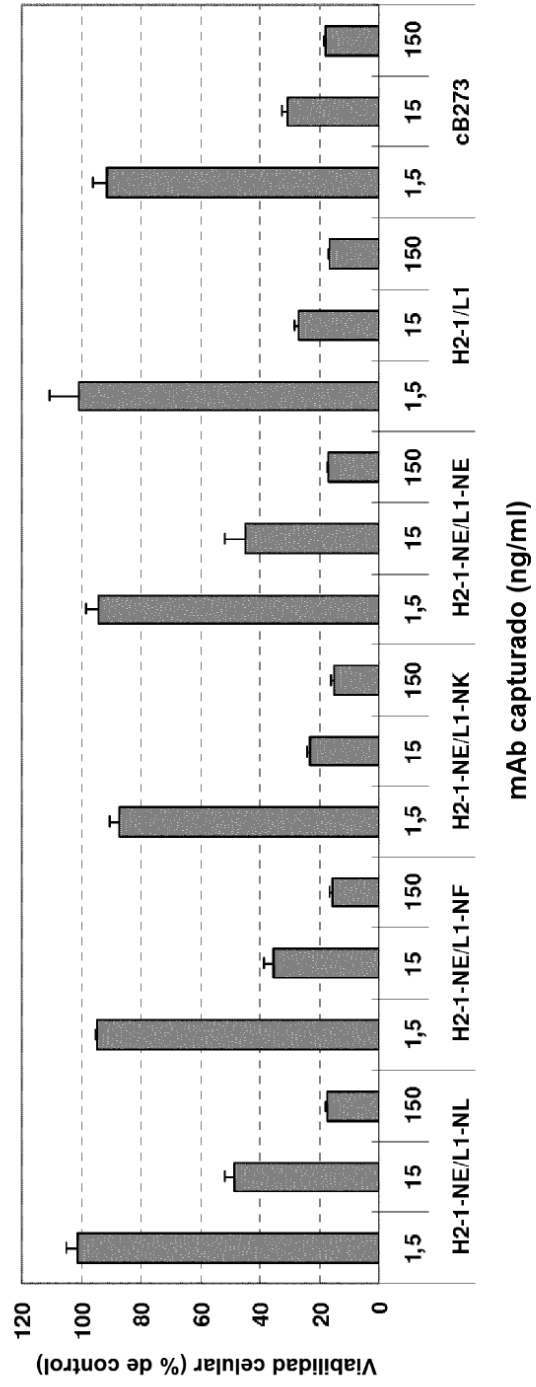
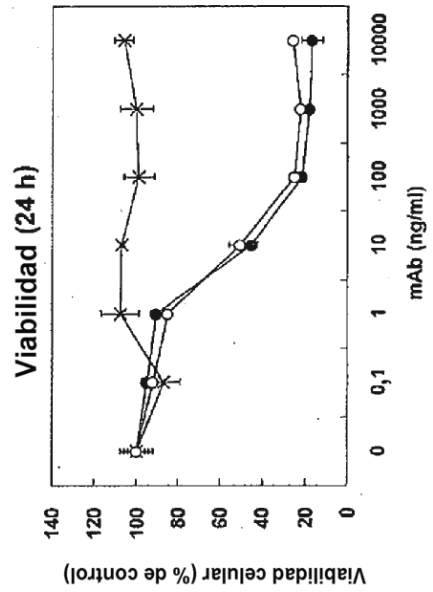
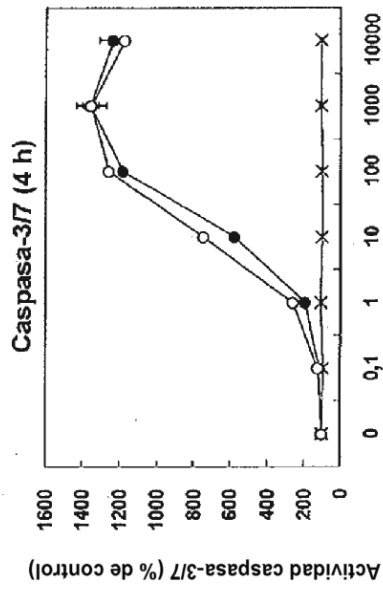


Fig. 15

A) HCT-15



B) U-87MG

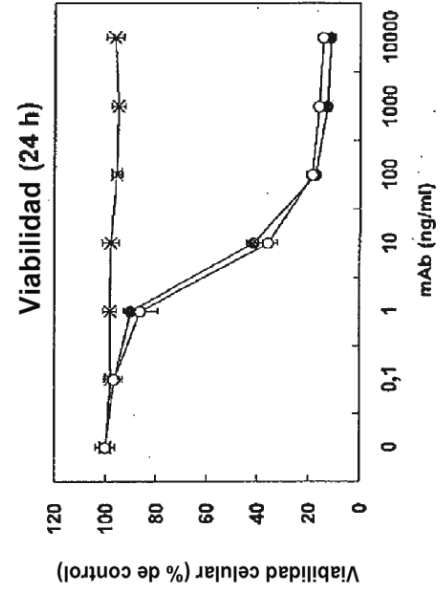
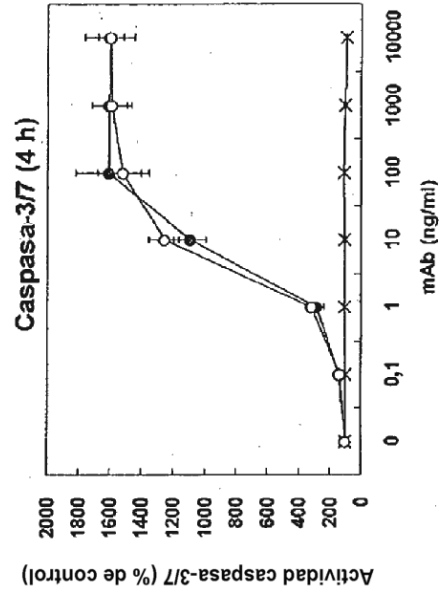
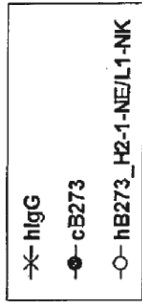


Fig. 16

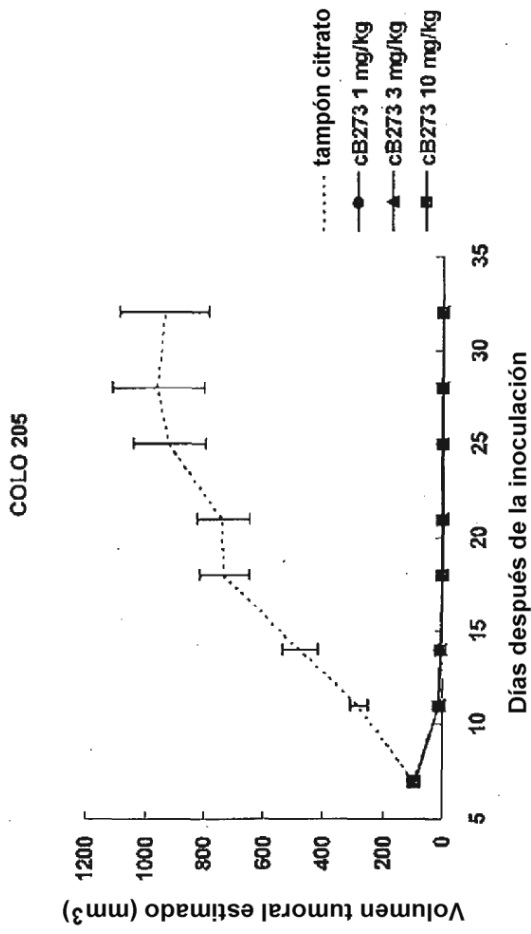


Fig. 17

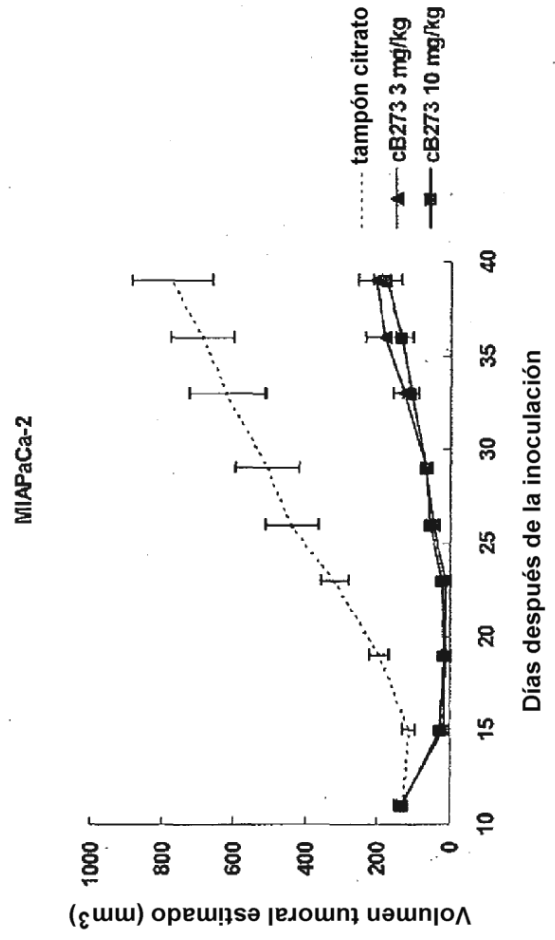


Fig. 18

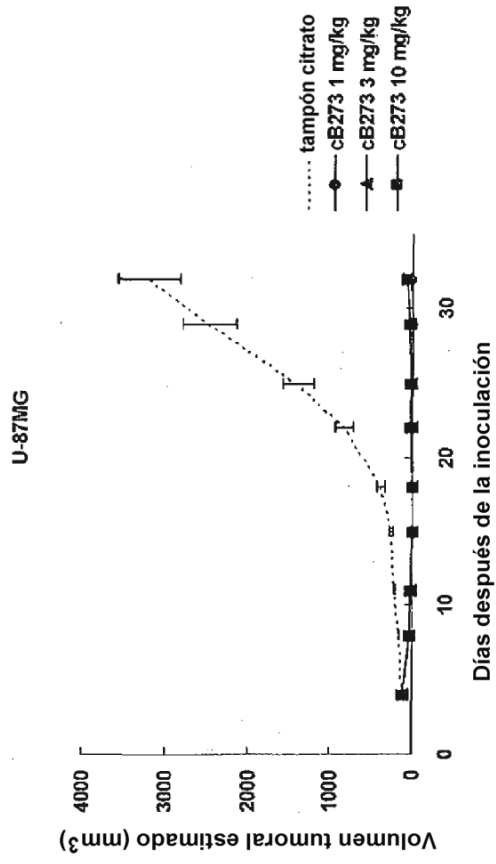


Fig. 19

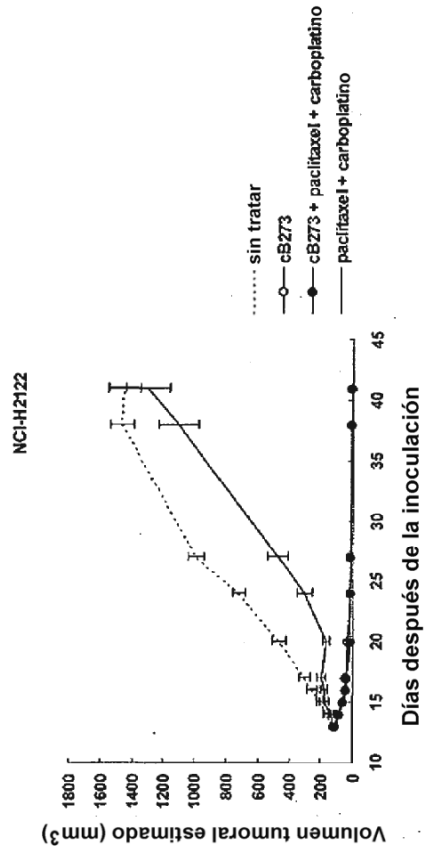


Fig. 20

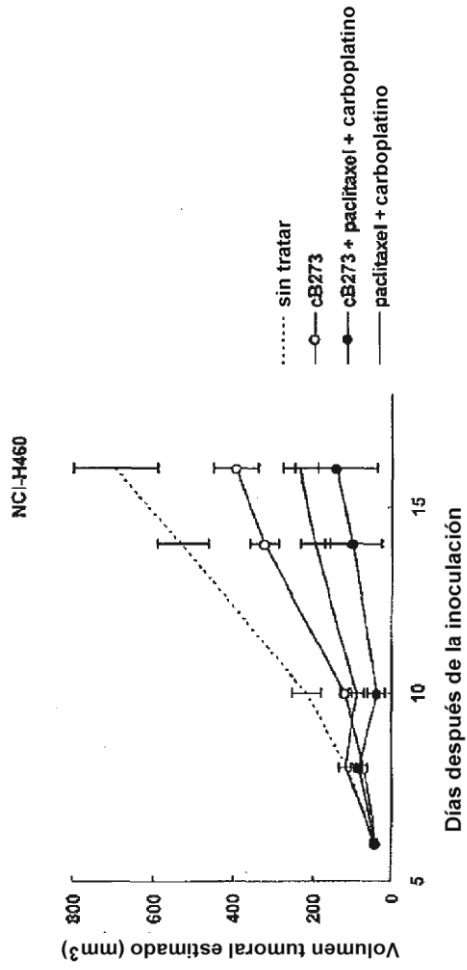


Fig. 21

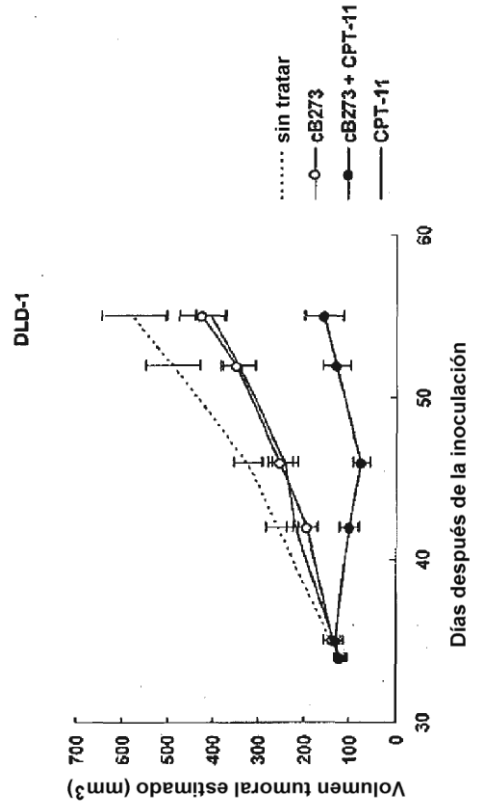


Fig. 22

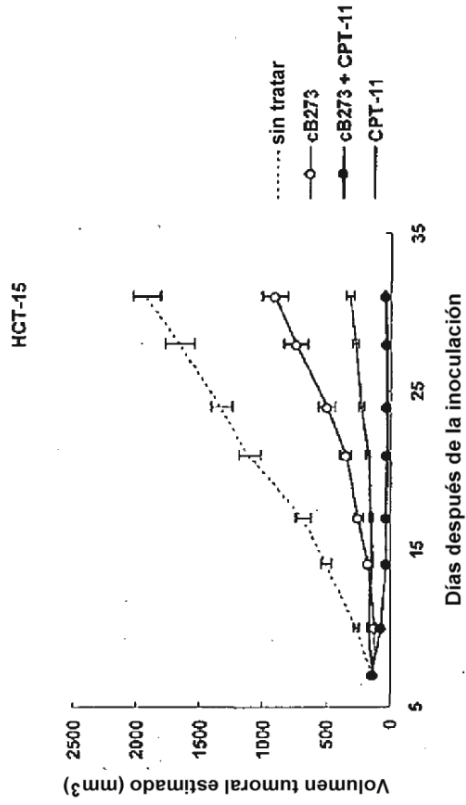


Fig. 23

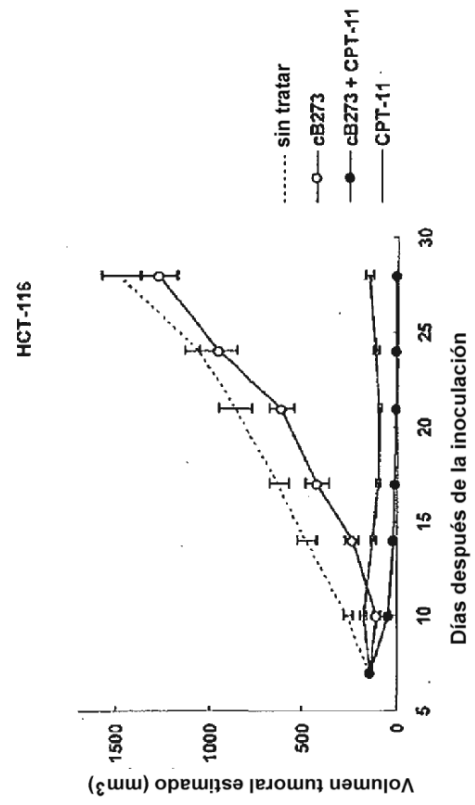


Fig. 24

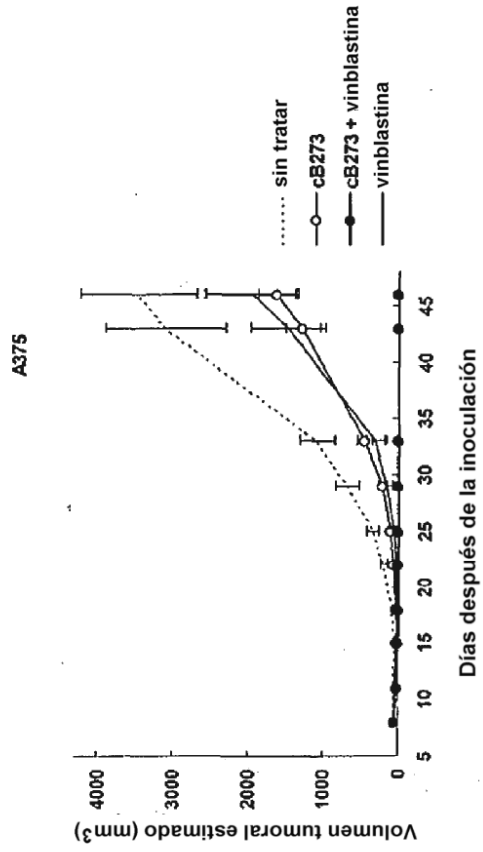


Fig. 25

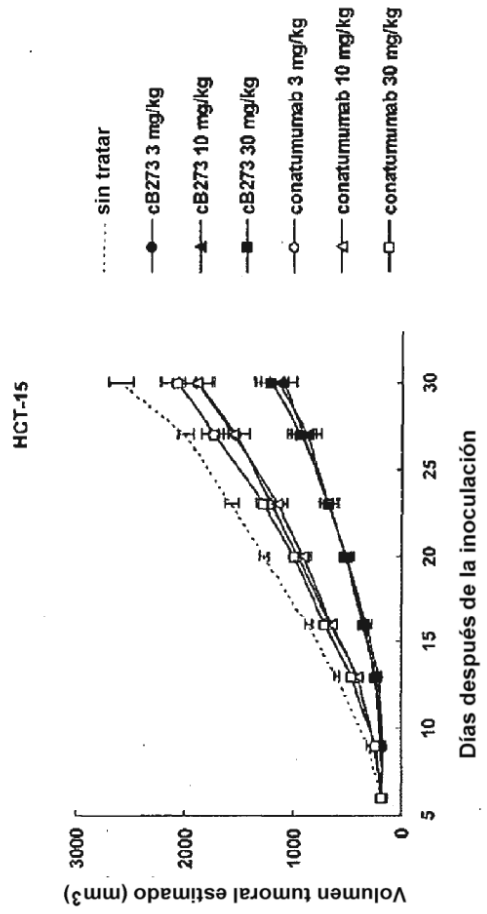


Fig. 26

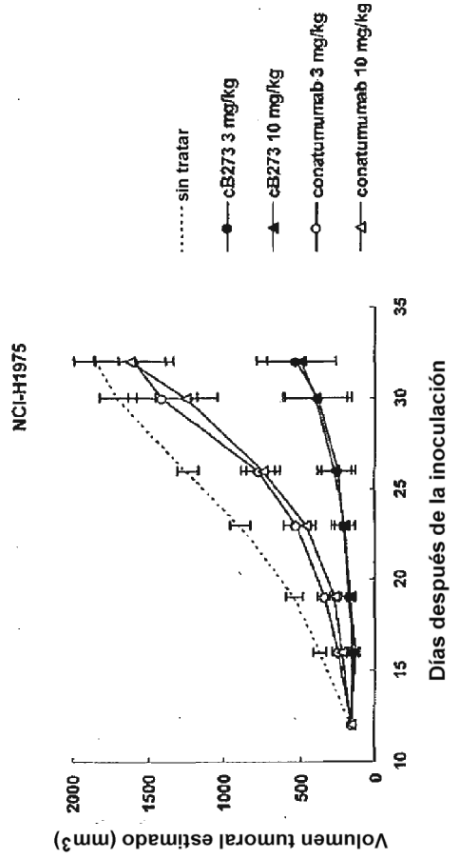


Fig. 27

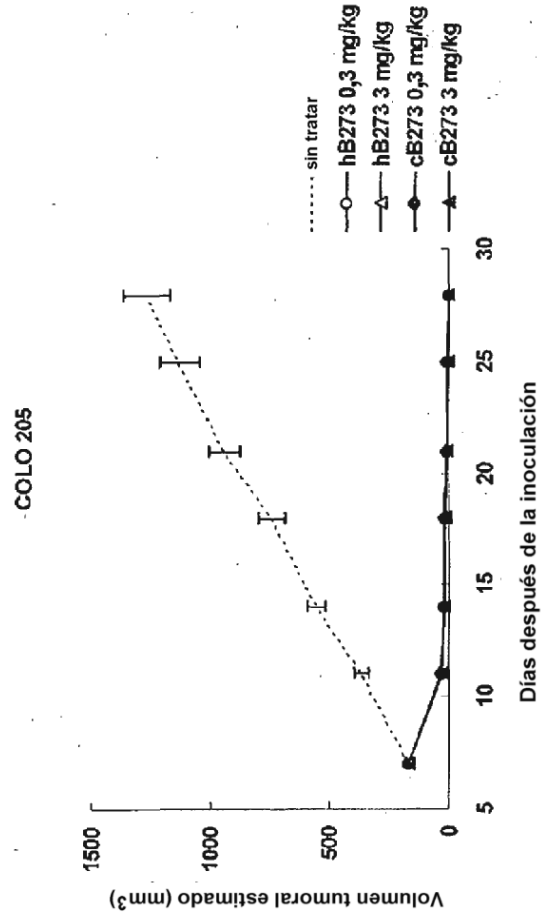


Fig. 28

SEQ ID NO: 7: Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica una cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón
 atgggatggagctgtatctttctctttctcctgtcagtaactgtaggtgtgttctctgaggttcagc
 tgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctgg
 ttactcatttattggctactttatgaactggatgaagcagagccatggaaagagccttgagtggatt
 ggacgttttaatacacaatggtgatactttctacaaccagaagttcaagggaaggccacattga
 ctgtagacaaatcctctaccacagcccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctgcagt
 ctatTTTTgtggaagatcggcgtattacttcgatagtgggggctactttgactactggggccaaggc
 accactctcacagtctcctcagccaaaacgacacccccatctgtctatccactggcccctggatctg
 ctgccccaaactaactccatggtgacctgggatgctggtcaagggtatTTTccctgagccagtgc
 agtgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgac
 ctctacactctgagcagctcagtgactgtccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgca
 acgttgcccaccggccagcagcaccagggtggacaagaaaattgtgcccagggtattgtggttgtaa
 gccttgcatatgtacagctccagaagtatcatctgtcttcatcttccccccaaagcccaaggatgtg
 ctaccattactctgactcctaaggtcacgtgtgttggttagacatcagcaaggatgatccccgagg
 tcagttcagctggttttagatgatgtggaggtgcacacagctcagacgcaacccccgggaggagca
 gttcaacagcactttccgctcagtcagtgaaacttcccacatgcaccaggactggctcaatggcaag
 gagttcaaatgcaggggtcaacagtgagctttccctgcccccatcgagaaaaccatctccaaaacca
 aaggcagaccgaaggctccacaggtgtacaccattccacctcccaggagcagatggccaaggataa
 agtcagtctgacctgcatgataacagacttcttccctgaagacattactgtggagtggcagtggaat
 gggcagccagcggagaactacaagaactcagcccatcatggacacagatggctcttacttctgtct
 acagcaagctcaatgtgcagaagagcaactgggaggcaggaaatactttcacctgctctgtgttaca
 tgagggcctgcacaaccaccatactgagaagagcctctcccactctcctggtaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1395)

SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón
 MGWSCIFLFLLSVTVGVFSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFIGYFMNWMKQSHGKSLEWI
 GRFNPNYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSTTAHMELLSLTSEDSAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGG
 TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD
 LYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDV
 LTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK
 EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWN
 GQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-465)

Fig. 29

SEQ ID NO: 9: Secuencia de nucléotidos de ADNc que codifica una cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón
atgaagttgctgcttaggctgctgggtgctgatgcttctggattcctgcttccagcagtgatgcttga
tgacccaaactccactctccctgctgctcagtccttgagatcaagcctccatctcttgcagatctag
tcagagccttgtagacacagtaattgaaacacctatctacattggtacctgcagaagccaggccagtct
ccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctgggggtcccagacaggttcagtgccagtg
gatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctgggaatttatttctg
ctctcaaagtacacatgcttccgtggacgcttcgggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgggctgat
gctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggagggtgcctcagtcg
tgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaag
acaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagc
accctcacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaaga
catcaacttcaccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtg

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-399), Región constante (400-714)

SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón
MKLPVRLLVLMFWIPASSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQS
PKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRAD
AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMS
SLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTTSTSPIVKSFNRNEC

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-133), Región constante (134-238)

Fig. 30

SEQ ID NO: 15: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo quimera de B273

atgggtgctgcagaccagggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgatgttg
tgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatctcttgcagatc
tagtcagagccttgtacacagtaatggaaacacctatctacattggtacctgcagaagccaggccag
tctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctgggggtccagacaggttcagtggca
gtggatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctgggaatttattt
ctgctctcaaagtacacatgttccgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgtacg
gtggccgccccctccgtgttcatcttccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgectccg
tggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctt
gcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcacctgacctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgaggtgacccacc
agggcctgagctccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtgt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 16: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo quimera de B273

MVLQTQVFI SLLLWISGAYGDVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ
SPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 31

SEQ ID NO: 19: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo quimera de B273

atgaaacacctgtggttcttctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcaggttcagc
 tgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctgg
 ttactcatttattggctactttatgaactggatgaagcagagccatggaaagagccttgagtggatt
 ggacgttttaatccatacaatggtgatactttctacaaccagaagttcaagggcaaggccacattga
 ctgtagacaaatcctctaccacagcccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctgcagt
 ctatTTTTGTGGAAGATCGGCgtattacttctgatagtgggggctactttgactactggggccaaggg
 accactctcacagtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctctcca
 agagcacctctggcggcacagccgacctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgacctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaaatcttgtgaaa
 aactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagttctctctcccc
 ccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtga
 gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggaaggcgtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggcttccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo quimera de B273

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFIGYFMNWMKQSHGKSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSTTAHMELLSLTSEDSAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGG
 TTLTVSSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 32

SEQ ID NO: 27: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1

atgggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
taatgaccagctctccgctgagctcttccctgtgactccagggagcccgcaagcatctcttgtcgcag
cagtcagtcactgggtccatagcaatgggaacacttacctgcattgggtacctccaaaaccagggcag
tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtggaggcagaagacgcttgaggtctatta
ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcgggtcccggcacaaaagtcgagatcaagcgtacg
gtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgctccg
tgggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctt
gcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcacctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgaggtgaccacc
agggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 28: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1

MVLQTQVFI SLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY LQKPGQ
SPQLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGS GDTFTLKI SRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 33

SEQ ID NO: 29: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L2

atgggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacgtcg
tcatgacacagacacctctgagcctgccctgtctctgggcgaaccgccagtatttcttgtaggtc
atctcagtctctgggtgcacagtaacggaaacacatatctccattggtacctgcagaagccaggtcag
tccccaaagctcctgatctataaggtgagcaacagattctccggagtgcctgatcgattcagcggga
gtggttcagggaccgacttcaccttgaagattagccgggtcgaggccgaggatggttgagtgatattt
ctgtagccagagtacacacgtgccctggaccttcggacctgggactaaagtgcgagattaaacgtacg
gtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcacccgctccg
tgggtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctc
gcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcacctgacctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgaggtgacccacc
agggcctgagctccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 30: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L2

MVLQTQVFI SLLLWISGAYGDVVM TQTPLSLPVS LGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ
SPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGS GTFDLTKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 34

SEQ ID NO: 31: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L3

atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgacgtgg
tgatgacgcagactccgctgtcactgcccgatatctctgggagagcctgccagcatcagctgcaggag
ctctcaatcactggtgcaactctaacggtaatacctacctccactggtatctccagaagccaggacia
tccccaaagttgctcatatataaaagtggtccaaccggttctcaggagtccttgaccggttagcggta
gtggctctggtacagatttcaccctgaaaatatcaagggttgaagcgggaagacgtaggagtgtat
ttgcagccagagcaccatgtccctggacatttggggcgccaccaaggtcgaaatcaagcgta
gtggccgccccctcctgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccg
tgggtgctgctgaataacttctacccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
gcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacgcctgagc
agcacctgaccctgagcaaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgctgcgaggtgaccacc
agggcctgagctccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtgt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 32: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L3

MVLQTQVFISLWISGAYGDVMTQTPLSLPVS LGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ
SPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGS GDTFTLKI SRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 35

SEQ ID NO: 33: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H1

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGcTgagcCAAGTTCAGC
 TCGTGCAGTCCGGCGCGGAGGTTAAGAAACCAGGCGCATCCGTTAAAGTGTGATGTAAGGCCAGCGG
 GTACTCCTTTATCGGCTACTTTATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGTATGGGCCTGGAGTGGATG
 GGACGGTTTAATCCATATAATGGCGATACTTTTTACAACCAGAAATTTAAAGGAAGGGTCACTCTCA
 CAGTGGATAAAAGCACTAGTACGGCTTACATGGAAGTGCCTCCCTCAGATCAGAAGATACTGCCGT
 CTACTACTGCGCCGAAGTGCTTACTATTTTCGACAGCGGGGGCTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGG
 ACCCTGGTAACTGTGagcTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA
 AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
 CGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTGCAGTCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCC
 CCAAACCCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCTCCCGTGTGGACTCCG
 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
 GGCAAA

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 34: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H1

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWVRQAPGMGLEWM
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 36

SEQ ID NO: 35: Secuencia de nucléótidos una cadena pesada de tipo hB273_H2

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtccagc
 tgggtgcagagtggagccgaggtataaaaaaccaggggctagtgtcaaggtctcctgtaaggcatctgg
 ttactcttttataggatacttcatgaaactggatgaagcagctctcccggatgtctctggagtgatt
 ggcagattcaaccctacaacggggacactttttataatcagaagttcaaagggaaagccactctga
 ccgtggacaagtcaactccacagcatacatggaattgtcctcactgaggtccgaagataaccgcegt
 gtacttctgcgctcggagtgcttattatttcgatagcggagggattttgactattgggggcaaggg
 acccttgtaaccgtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcaagccgacctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccgctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgacctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaaatcttgtgaaa
 aactcacacatgcccaccctgcccagcactgaactcctggggggaccctcagtccttctctcccc
 ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggcagctga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggtgaaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggttctatcccagcgcacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal {1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 36: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIFYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARSAYYFDSSGGYFDYWQGG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 37

SEQ ID NO: 37: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H3

atgaaacacctgtggttcttccctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaagtgcagc
tcgtgcaaagcggcgctgaagtgaaaaaccaggagcctcagtcaaagtgtcctgtaaggcctccgg
gtatagcttcatcggctatTTTTATGAactggatgaagcagagcccgggcaaaagcctcgaatggatc
gggagattcaatccatacaatggtgacacctTTTACAatcagaaattcaaaggcaaggccaagctga
ctgtagacaaatccaccagcacagcccacatggaattgtcttccctgaggctgaggataaccgcggt
gtactTTTGTggccgaagtgcgtattatttCGattcaggcgggtacttCGattactggggtcagggg
acgctcgtcaccgtaagctcagcctccaccaaggGCCAAGcgtcttccccctggcaccctcctcca
agagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgctggctcaaggactacttccccgaaccgctgac
cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagctcctca
ggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
gcaacgtgaatcaaaagccagcaaaccaaggtggacaagagagttgagccaaatcttgtgacaa
aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagcttctctcttcccc
ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggaggcgtga
gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggcggcgtggaggtgcataatgccaaagac
aaagccccgggaggagcagtacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcacgctcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatcccggga
ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
acggctccttcttctctacagcaagctcacgctggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 38: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H3

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIFYFMNWMKQSPGKSLEWI
GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAHMELSSLRSEDTAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 38

SEQ ID NO: 39: Secuencia de nucléótidos de una cadena pesada de tipo hB273_H1-1

atgaaacacctgtggttcttctctctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcttctgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggtacttcatgaactggatgcggcaggccccctggcatgggactggaatggatg
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaaattcaagggcagagtgacctga
 ccgtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcgagcagaggataaccgccgt
 gtatttctgcggcagaagcgcctactacttccgacagcggcggtacttccgactactggggccagggc
 acctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggaacagccgccccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaacctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccccctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcaaaagccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccacctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagctcttctcttcccc
 ccaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtga
 gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcaagcgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggtgaaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 40: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H1-1

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWMRQAPGMGLEWM
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 39

SEQ ID NO: 41: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-1

atgaaacacctgtggttcttctctctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagtccaagggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgctacatggaactgagcagcctgcggagcgaggataaccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgcctactacttgcagcagcggcggctacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgacctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgtgaaa
 aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttctcttcccc
 caaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggtgaaatggcaaggagtacaagtgaaggttccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatcccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 42: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-1

MKHLWFFLLLVAAPRWLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 40

SEQ ID NO: 43: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-2

atgaaacacctgtgggttcttctctctgctgggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccacctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcccacatggaactgagcagcctgcggagcgaggataccgccgt
 gtacttctgcgcccagaagcgcctactacttcgacagcggcggctacttcgactactggggccagggc
 acctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgtgaaa
 aactcacacatgcccacctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagttctctcttcccc
 caaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcacctcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatcccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgcacatgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 44: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSF IGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPNYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAHMELSSLRSEDVAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 41

SEQ ID NO: 45: Secuencia de nucléótidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-3

atgaaacacctgtggttcttctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagc
 tgggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagtccaagggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcccacatggaactgagcagcctgcggagcgaggataccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgcctactacttgcagcagcggcgtacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaaatcttgtgaaa
 aactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttcttcccc
 ccaaaaccaaggaacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtga
 gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggtgtaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 46: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-3

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAHMELSSLRSEDTAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWQGG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 42

SEQ ID NO: 47: Secuencia de nucléótidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-4

atgaaacacctgtggttcttctctctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagtccaagggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcagggataccgccgt
 gtacttctgcggcagaagcgcctactacttctgacagcggcggctacttctgactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcgccacagccgcccctgggctgctgggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaactggaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactctgtgacaa
 aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactctggggggaccctcagtccttctcttcccc
 ccaaaaccaaggacaccctcatgatctccccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcagtaaccgggtggtcagcgtcctcacctcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgcccccatccccgga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 48: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-4

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIFYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 43

SEQ ID NO: 49: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-5

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcaagagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcgagcagaggataaccgcct
 gtacttctgcggcagaagcgcctactacttccgacagcggcggctacttccgactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgacagcgtgcctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttcttcccc
 caaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
 aaagccccgggagggagcagtaaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 50: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-5

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIFYFMNWMKQSPGKSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWQGG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 44

SEQ ID NO: 51: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NE

atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgacatcg
taatgaccagctctccgctgagtcttctctgtgactccagggagcccgcaagcatctcttgtcgcag
cagtcagtcactggtccatagcaatgagaacacttacctgcattggtacctccaaaaaccagggcag
tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtggaggcagaagacgcttggagtctatta
ttgctcacagagcacacatgtccctggactttcggccccggcacaaaagtcgagatcaagcgtaog
gtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccg
tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
gcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcacctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagaggtgaccacc
agggcctgagctcccccgtcaccaagagcttcaacagggggagtgt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 52: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NE

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLVHSNENTYLHWYLQKPGQ
SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 45

SEQ ID NO: 57: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NF

atgggtgctgcagaccaggtgttcacatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgacatcg
taatgaccagctctccgctgagctcttctctgtgactccaggggagcccgaagcatctcttgtcgcag
cagtcagtcactggtccatagcaatttcaacacttaoctgcatgtgttacctccaaaaaccagggcag
tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtgaggcagaagacggttgagctatta
ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcgggtcccggcacaaaagtcgagatcaagcgtacg
gtggcgcgccctccgtgttcacatctccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccg
tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
gcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcacctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgogaggtgaccacc
agggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 58: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NF

MVLQTQVFI SLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLVHSNFNTYLHWYLQKPGQ
SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 46

SEQ ID NO: 61: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NK

atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
taatgaccagctctccgctgagtcttctctgtgactccagggagcccgcaagcatctcttgctcgag
cagtcagtcactggtccatagcaataagaacacttacctgcattggtacctccaaaaccagggcag
tcccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtggaggcagaagacgcttgagctatta
ttgctcacagagcacacatgtccctggactttcggccccggcacaaaagtcgagatcaagcgtaag
gtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgcctccg
tggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
gcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcacctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagaggtgaccacc
agggcctgagctccccgctaccaagagcttcaacagggggagtgt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 62: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NK

MVLQQTQVFI SLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLVHSNKNTYLHWYLQKPGQ
SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 47

SEQ ID NO: 65: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NL

atgggtgctgcagacccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgacatcg
taatgaccagctctccgctgagctcttccctgtgactccaggggagcccgaagcatctcttgtcgag
cagtcagtcactggccatagcaatctgaacaattacctgcattggtacctccaaaaaccagggcag
tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgtgctgaccgcttctccggaa
gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtggaggcagaagacgttggagtctatta
ttgctcacagagcacacatgtccctggactttcgggcccgacaaaagtcgagatcaagcgtacg
gtggccgccccctccgtgttcattcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccg
tgggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
gcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcacctgaccctgagcaaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgctgagaggtgaccacc
agggcctgagctccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Secuencia señal <1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 66: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NL

MVLQTQVFI SLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTPEPASI SCRSSQSLVHSNLNTYLHWYLQKPGQ
SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 48

SEQ ID NO: 69: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE

atgaaacacctgtggttcttctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacgaggacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccacctga
 cagtgagacaagagcaccagcaccgctacatggaactgagcagcctgctggagcagggataccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgcctactacttgcacagcggcggctacttgcactactggggccagggc
 acctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccagcgtcttccccctggcaccctctcca
 agagcacctctggcggcacagccgctgggtgctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgtgaaa
 aactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagttcttcttcccc
 ccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatcccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 70: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNEDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWQGG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 49

SEQ ID NO: 75: Secuencia de nucléotidos de ADNc que codifica una cadena ligera de conatumumab

atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgaatcg
tgttgacacagagtcccggcactcttagccttagccgggtgaacgcgccaccctgtcctgccgcgc
ctctcaggggaatctctcgctcttacctcgcgtggtagaccagcagaaaccgggccaggccccagtttg
ctgatatacgggtgcctctagccgagcaactggcatcccagaccggttctcaggatctggctccggga
ctgacttcaactctgaccatctccagactggagcccaggatttcgcggtatattactgccagcagtt
cggcagcagtccttggaccttcggacagggtaactaaggtggagattaaacgtacggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctgc
tgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtcgggaa
ctcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctgacc
ctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagct
ccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtgt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-390), Región constante (400-705)

SEQ ID NO: 76: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de conatumumab

MVLQTQVFI SLLLWISGAYGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQKPGQAPSL
LIYGASSRATGIPDRFSGSGSTDFTLTISRLEPEDFAVYQCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-130), Región constante (131-235)

Fig. 50

SEQ ID NO: 77: Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica una cadena pesada de conatumumab
 atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 ttcaggaaagcgggccggcctcgtgaagccctcccagaccctgtctcttacttgtacagtgagcgg
 tggcagcatttcttcaggcgattacttctggagttggattcgccaactgcctggtaaagggctggaa
 tggatcgggcatattcacaattcaggaaccacatattataacccttactgaagagccgggtaacta
 tctccgttgacactagcaagaaacagttctccctccggctgtcttctgtcacagccgctgacaccgc
 tgtttactactgtgcaagagatcgggggtggcactactattacggcatggatgtttggggacagga
 accaccgtaacagtgagctcagcctccaccaagggoccaaagcgtcttccccctggcaccctctcca
 agagcaccctctggcggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggacccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactctgtgaaa
 aactcacacatgcccaccctgccagcactgaactcctggggggaccctcagttctctctctcccc
 ccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtaacaagcagcgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggtcctctcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 78: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de conatumumab
 MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLE
 WIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQG
 TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 51

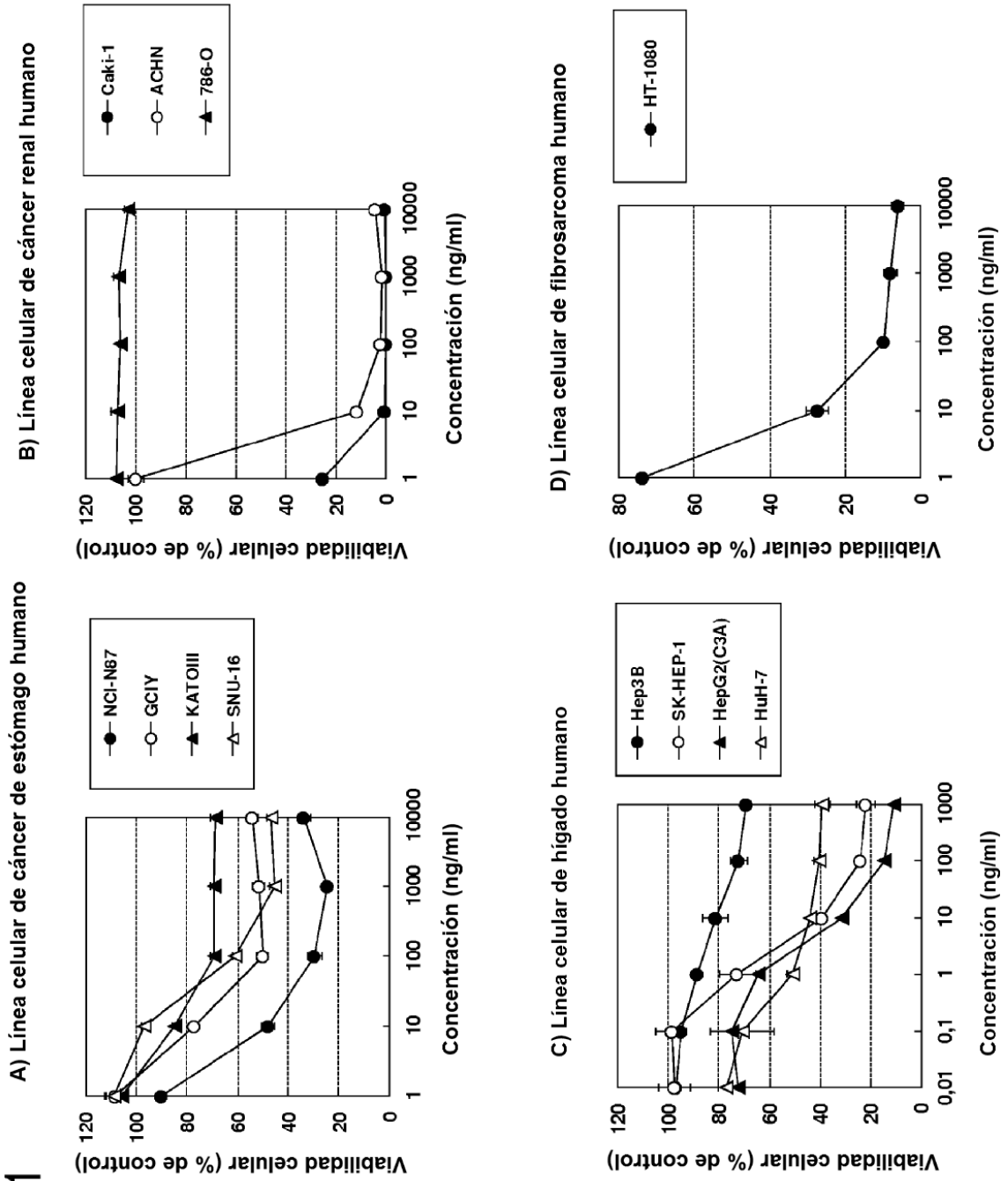


Fig. 52

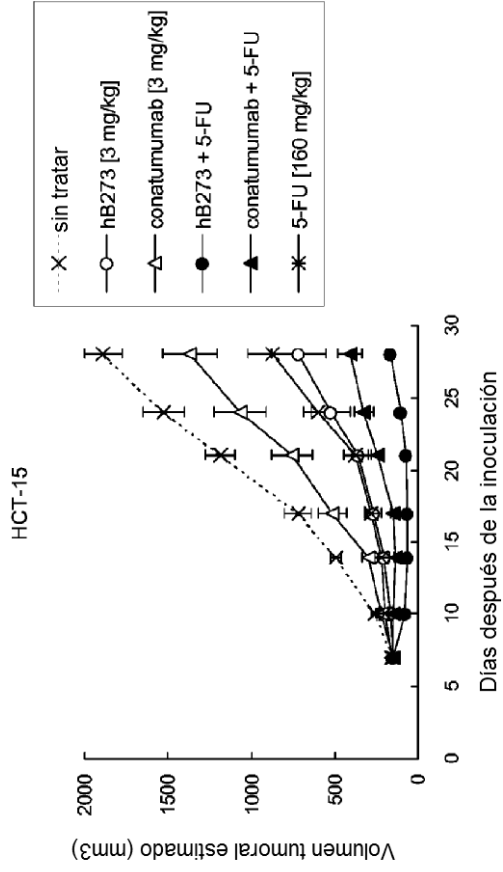


Fig. 53

