

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 782**

51 Int. Cl.:

| | |
|--------------------|-----------|
| C07K 16/28 | (2006.01) |
| A61K 39/395 | (2006.01) |
| A61P 35/00 | (2006.01) |
| A61P 35/02 | (2006.01) |
| C12N 1/15 | (2006.01) |
| C12N 1/19 | (2006.01) |
| C12N 1/21 | (2006.01) |
| C12N 5/10 | (2006.01) |
| C12N 15/09 | (2006.01) |
| C12P 21/08 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2013 PCT/JP2013/080249**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14073641**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2013 E 13853637 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2918603**

54 Título: **Anticuerpo capaz de reconocer específicamente un receptor de transferrina**

30 Prioridad:

08.11.2012 JP 2012246215

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

15.11.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF MIYAZAKI (50.0%)
1-1, Gakuen Kibana-dai Nishi Miyazaki-shi
Miyazaki 889-2192, JP y
PERSEUS PROTEOMICS INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

KUROSAWA, YOSHIKAZU;
MORISHITA, KAZUHIRO;
ZHANG, LILIN;
KUROSAWA, GENE;
MITOMO, KATSUYUKI;
SUDO, YUKIO;
NOMURA, FUMIKO y
UKAI, YOSHINORI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 689 782 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo capaz de reconocer específicamente un receptor de transferrina

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-TfR que reacciona específicamente con un antígeno de TfR humano. Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-TfR y, particularmente, a una composición farmacéutica asociada con el tratamiento de un tumor maligno.

10

Técnica anterior

El cáncer es la primera causa de muerte en Japón y, con el envejecimiento, el número de pacientes que padecen cáncer ha aumentado cada año. Por tanto, ha existido un deseo intenso de desarrollar un fármaco o un método de tratamiento que sea muy eficaz y muy seguro. La quimioterapia convencional, radioterapia convencional y similares han sido problemáticas en cuanto a que provocan daño a células normales, así como destruyen células cancerosas, y provocan fuertes efectos secundarios. Con el fin de resolver este problema, se han llevado a cabo de manera intensa estudios respecto a la terapia dirigida a nivel molecular, en la que se diseña un fármaco que se dirige a una molécula que se expresa específicamente en una célula cancerosa, y la terapia se lleva a cabo usando el fármaco. Entre tales agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos a nivel molecular, los fármacos de anticuerpo han atraído una atención considerable porque son ventajosos en cuanto a su larga semivida y pocos efectos secundarios. Los ejemplos de agentes terapéuticos contra el cáncer desarrollados con éxito incluyen un anticuerpo quimérico Rituxan que se dirige a CD20 (documento no de patente 1), un anticuerpo humanizado Herceptin que se dirige a Her2/neu (documento no de patente 2) y un anticuerpo humanizado Avastin que se dirige a un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Estos anticuerpos se han usado para cáncer como enfermedad diana y sus efectos terapéuticos se han reconocido.

Los anticuerpos que se usan como agentes terapéuticos se dividen en anticuerpos no marcados y anticuerpos marcados. Se considera que los mecanismos de acción de tales anticuerpos no marcados son: (1) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (documento no de patente 3) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (documento no de patente 4), que se asocian con inmunocitos o moléculas; (2) inhibición de señales asociadas con supervivencia o crecimiento intracelular mediante moléculas diana; (3) inducción de apoptosis; y (4) regulación de secreción de citocinas. Al combinar estos mecanismos, el anticuerpo no marcado destruye células tumorales o termina con el crecimiento de las mismas, para presentar sus efectos terapéuticos. Por otro lado, se forma un anticuerpo marcado uniendo una sustancia radiactiva o una sustancia citotóxica tal como una toxina, una enzima o un fármaco a un anticuerpo, y la especificidad del anticuerpo se usa para administrar una sustancia de este tipo sólo a tejidos cancerosos, para lograr la mejora de efectos terapéuticos y una reducción en efectos secundarios.

En primer lugar, se identificó un receptor de transferrina (TfR) como un receptor que está presente sobre un reticulocito como una estructura de membrana celular para incorporar hierro unido a transferrina (Tf) en una célula (documento no de patente 5). Después de eso, se descubrió que el receptor de transferrina (TfR) se expresa en trofoblastos placentarios (documentos no de patente 10 a 12), en linfocitos activados (documento no de patente 12) y, además, en diversas células tumorales. Se ha notificado que el receptor de transferrina (TfR) se expresa a un nivel elevado, por ejemplo, en cáncer de mama (documento no de patente 6), cáncer de próstata (documento no de patente 7), cáncer de pulmón (documento no de patente 8), cáncer pancreático (documento no de patente 9), cáncer de colon (documentos no de patente 30 y 31), cáncer de estómago (documento no de patente 31), cáncer de vejiga (documentos no de patente 32 y 33), cáncer hepático (documento no de patente 34), cáncer de cuello uterino (documento no de patente 35), tumor cerebral (documento no de patente 36), leucemia linfocítica crónica (documentos no de patente 37 y 38), linfoma no Hodgkin (documentos no de patente 38 y 39) y leucemia de células T del adulto (documento no de patente 40). Además, puesto que TfR se expresa sobre la superficie de diversos tipos de células cancerosas a un nivel elevado y se expresa en células normales a un nivel bajo, este receptor se había reconocido como una diana molecular para la terapia contra el cáncer desde hace mucho (documentos no de patente 13 a 16 y documentos de patente 1 y 2). Sin embargo, todos los anticuerpos anti-TfR humano desarrollados previamente derivaron de animales y, además, no tuvieron un efecto de inhibición de crecimiento tumoral significativo. Se ha conocido generalmente que, cuando un anticuerpo derivado de un animal distinto de un humano, tal como un anticuerpo de ratón, se administra a un humano, el anticuerpo administrado se reconoce como una materia extraña, de modo que un anticuerpo humano contra el anticuerpo de ratón (anticuerpo anti-ratón humano: a continuación en el presente documento denominado HAMA) se induce en el cuerpo humano. Se ha conocido que el HAMA reacciona con el anticuerpo de ratón administrado y provoca efectos secundarios (documentos no de patente 17 a 20) o acelera la desaparición del anticuerpo de ratón administrado del cuerpo (documentos no de patente 18, 21 y 22), reduciendo de ese modo los efectos terapéuticos del anticuerpo de ratón (documentos no de patente 23 y 24). De hecho, se llevó a cabo un ensayo clínico de fase 1 usando un determinado anticuerpo anti-TfR humano de ratón. Como resultado, se observó la generación de HAMA y no se encontraron efectos terapéuticos significativos (documento no de patente 25).

Con el fin de evitar un problema de este tipo, se desarrolló un anticuerpo quimérico (documentos de patente 3 y 4). El anticuerpo quimérico comprende porciones de anticuerpos derivados de dos o más especies (una región variable de anticuerpo de ratón y una región constante de anticuerpo humano, etc.). Un anticuerpo quimérico de este tipo es ventajoso en cuanto a que mantiene las características de un anticuerpo de ratón, tiene Fc humano y, por tanto, es capaz de estimular un complemento humano o citotoxicidad. Sin embargo, un anticuerpo quimérico de este tipo todavía provoca una respuesta de "anticuerpo anti-quimérico humano," concretamente HACA (anticuerpo anti-quimera humano) (documento no de patente 26). Además, se desarrolló un anticuerpo recombinante, en el que sólo una porción de un anticuerpo sustituido es una región determinante de complementariedad (es decir, "CDR") (documentos de patente 5 y 6). Usando una técnica de trasplante de CDR, se preparó un anticuerpo que consiste en una CDR de ratón y región estructural de región variable humana y región constante, concretamente, "anticuerpo humanizado" (documento no de patente 27). Sin embargo, incluso un anticuerpo humanizado de este tipo tiene inmunogenicidad para humanos y, por tanto, provoca una reacción de HAH (anticuerpo humano anti-humano) (documentos no de patente 28 y 29). Por consiguiente, ha existido el deseo de desarrollar un fármaco de anticuerpo más seguro y eficaz que no tenga inmunogenicidad, que pueda aplicarse a sitios clínicos.

Además, con el fin de superar la inmunogenicidad de un anticuerpo terapéutico, también se ha desarrollado un método para producir un anticuerpo humano completo. Por ejemplo, puede obtenerse un anticuerpo humano deseado inmunizando un animal transgénico que tiene todo el repertorio de genes de anticuerpo humano con un antígeno deseado (documentos de patente 7 a 12). Además, se ha conocido una técnica de obtención de un anticuerpo humano mediante cribado de una biblioteca de anticuerpo humano. Por ejemplo, se permite que una región variable de un anticuerpo humano se exprese como un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) sobre la superficie de un fago mediante un método de presentación de fagos, y después puede seleccionarse una unión de fase a un antígeno. Analizando el gen del fago seleccionado, puede determinarse una secuencia de ADN que codifica para la región variable de un anticuerpo humano que se une al antígeno. Se construye un vector de expresión que es más adecuado para la secuencia de ADN del scFv, y puede obtenerse un anticuerpo humano completo (documentos de patente 13-18). Mediante un método de presentación de fagos de este tipo aplicado al anticuerpo humano scFv, se ha obtenido un anticuerpo de fago anti-TfR humano (documento de patente 20). También es importante para el descubrimiento de fármacos de anticuerpo para obtener un anticuerpo que reconoce un antígeno de cáncer diana en "forma nativa" que está presente sobre la superficie de una membrana celular, y el efecto farmacológico del anticuerpo obtenido es diferente según el método de cribado o una diferencia de selección. Los presentes inventores han producido hasta ahora una enorme biblioteca de anticuerpos humanos que consiste en cien mil millones de clones independientes y han establecido un método integral para obtener anticuerpos contra proteínas que existen sobre la superficie de la membrana de las células cancerosas (antígenos de superficie celular) mediante una técnica original usando varias decenas de tipos de células cancerosas (documento de patente 19).

Bibliografía de la técnica anterior

Bibliografía de patentes

Documento de patente 1: patente estadounidense n.º 5.667.781

Documento de patente 2: patente estadounidense n.º 7.976.841

Documento de patente 3: patente europea n.º 120694

Documento de patente 4: patente europea n.º 125023

Documento de patente 5: patente británica n.º GB2188638A

Documento de patente 6: patente estadounidense n.º 5.585.089

Documento de patente 7: WO 93/12227

Documento de patente 8: WO 1992/03918

Documento de patente 9: WO 1994/02602

Documento de patente 10: WO 1994/25585,

Documento de patente 11: WO 1996/34096,

Documento de patente 12: WO 1996/33735

Documento de patente 13: WO 1992/01047

Documento de patente 14: WO 1992/20791,

Documento de patente 15: WO 1993/06213

Documento de patente 16: WO 1993/11236

5

Documento de patente 17: WO 1993/19172

Documento de patente 18: WO 1995/01438

10 Documento de patente 19: patente japonesa n.º 4870348

Documento de patente 20: WO 2011/073943

Bibliografía no de patentes

15

Documento no de patente 1: Mass R, *et al.*, Proc Am Soci Clin Oncol 19,75a, 2000

Documento no de patente 2: Berinstein NL, *et al.*, Annals of Oncology 1998, 9: 995-1001.

20

Documento no de patente 3: Bruggemann M., *et al.*, J. Exp. Med., 166, 1351-1361.

Documento no de patente 4: Loos M. (1982). Prog. Allergy, 30, 135-192. Mol Immunol. Mayo de 1982; 19(5): 651-7.

Documento no de patente 5: J Clin Invest 1963; 42, 314-326

25

Documento no de patente 6: Int J Cancer 1981; 27: 329- 334,

Documento no de patente 7: J Urol 1990; 143: 381-385,

30

Documento no de patente 8: Cancer Gene Ther 2000; 7: 59-65;

Documento no de patente 9: Eur J Cancer 2004; 40 (9): 1418-1422

Documento no de patente 10: J Clin Invest 1980; 65: 1182-1191.

35

Documento no de patente 11: Placenta 1986; 7: 391-403

Documento no de patente 12: J Clin Invest (1980) 66, 1135-1143,10

40

Documento no de patente 13: Proc. Natl Acad Sci USA 1982; 79: 1175-1179,

Documento no de patente 14: Cancer Res 1986; 46: 1759-1763,

Documento no de patente 15: Cancer Res 1990; 50: 6295-6301,

45

Documento no de patente 16: Blood 2004; 103: 1838-1845

Documento no de patente 17: J. Clin. Oncol., 2, 881 (1984)

50

Documento no de patente 18: Blood, 65, 1349 (1985)

Documento no de patente 19: J. Natl. Cancer Inst., 80, 932 (1988)

Documento no de patente 20: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 82, 1242 (1985)

55

Documento no de patente 21: J. Nucl. Med., 26, 1011(1985)

Documento no de patente 22: J. Natl. Cancer Inst., 80, 937 (1988)

60

Documento no de patente 23: J. Immunol., 135,1530 (1985)

Documento no de patente 24: Cancer Res., 46, 6489 (1986)

Documento no de patente 25: Clini. Cancer. Res. 1995; 1: 1259-1265

65

Documento no de patente 26: J. Exp. Med., 170,2153-2157, 1989

Documento no de patente 27: Nature, 332, 323-327, 1988

Documento no de patente 28: Cancer Res. 2001; 61: 6851-6859,

Documento no de patente 29: J Pharm Biomed Anal. 2006; 41: 1347-1353

Documento no de patente 30: Int J Oncol. 1998; 13(4): 871-5

Documento no de patente 31: Tohoku J. exp. Med. 1987; 153: 239-243

Documento no de patente 32: Urol. Res. 1987; 15: 341-344

Documento no de patente 33: Br. J. Urol. 1990; 65: 339-344

Documento no de patente 34: Histopathology 1988; 12: 53-63

Documento no de patente 35: J. Clin. Pathol. 1984; 37: 131-135

Documento no de patente 36: A Pathol. Anat. Histopathol. 1990; 416: 491-496

Documento no de patente 37: Leukemia 1993; 7:2019-2025

Documento no de patente 38: Hematol. Pathol. 1990; 4: 37-41

Documento no de patente 39: Lancet 1983; 1: 498-501

Documento no de patente 40: Blood 2004; 103: 1838-1845

Sumario de Invención

Objeto que va a resolverse mediante la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo humano completo que tenga un fuerte efecto de inhibición del crecimiento tumoral sobre TfR como diana. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir el anticuerpo mencionado anteriormente y un agente terapéutico para una enfermedad tal como cáncer que comprende el anticuerpo mencionado anteriormente.

Medios para resolver el objeto

Tal como se mencionó anteriormente, se había desarrollado un anticuerpo que se dirige a TfR como agente antitumoral. Sin embargo, puesto que este anticuerpo se había derivado de un animal, el desarrollo de un fármaco de anticuerpo no había sido satisfactorio debido a la generación de HAMA, insuficientes efectos del fármaco, etc. Por tanto, los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos con respecto al método de producción de anticuerpos original descrito en el documento de patente 19 y, como resultado, han obtenido un anticuerpo de fago (anticuerpo scFv) que reacciona con TfR que existe sobre la membrana de la célula cancerosa, usando una presentación de fago de biblioteca de anticuerpos humanos. Los inventores han modificado tales anticuerpos de scFv para proporcionar inmunoglobulinas, para preparar anticuerpos IgG humanos completos.

Además, para los siguientes fines respecto al anticuerpo, concretamente, para (1) la mejora de la productividad, (2) la mejora de la estabilidad de conservación y (3) la mejora de efectos antitumorales, se modificó al menos un aminoácido de la CDR de la región variable del anticuerpo anti-TfR humano completo obtenido, y se intentó la optimización del anticuerpo anti-TfR para aplicación clínica. Como resultado, se encontró que el anticuerpo mutante obtenido reacciona con TfR humano al mismo nivel que la cepa original y tiene un efecto antitumoral más fuerte. En particular, el anticuerpo de la presente invención obtenido tal como se describió anteriormente fue mucho mejor que los anticuerpos anti-TfR humano descritos en el documento de patente 20 y el documento WO 2012/153707, en cuanto a efecto de inhibición de tumores. Basándose en estos hallazgos, se demostró que estos anticuerpos son útiles para el tratamiento de diversos cánceres en los que TfR se expresa a un nivel elevado, completando de ese modo la presente invención.

Específicamente, según la presente invención, se proporcionan anticuerpos que reaccionan específicamente con TfR humano, que se seleccionan de los siguientes (1), (3), (4), (33) y (34). También se divulgan, pero no son parte de la invención, anticuerpos que reaccionan específicamente con TfR humano, que se seleccionan de los siguientes (2) y (5) a (32).

(1) Un anticuerpo, en el que la primera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR1 de

5 VH), la segunda región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR2 de VH) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR3 de VH) se muestran en SEQ ID NO: 1, 54, 3, respectivamente, y la primera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR1 de VL), la segunda región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR2 de VL) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR3 de VL) se muestran en SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente.

Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

10 Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), una región V dimerizada (diacuerpo) y una región V estabilizada por disulfuro (dsFv).

15 Según la presente invención, se proporciona ADN que codifica para el anticuerpo descrito anteriormente de la presente invención.

Según la presente invención, se proporciona un vector recombinante que comprende el ADN descrito anteriormente de la presente invención.

20 Según la presente invención, se proporciona una línea celular transformada obtenida mediante la introducción del vector recombinante descrito anteriormente de la presente invención en una célula huésped.

25 Según la presente invención, se proporciona un método para producir el anticuerpo de la presente invención, que comprende cultivar la línea celular transformada descrita anteriormente de la presente invención en un medio, después permitir que la línea celular genere y acumule el anticuerpo de la presente invención en el cultivo, y después recoger el anticuerpo del cultivo.

Según la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo descrito anteriormente de la presente invención.

30 Según la presente invención, se proporciona la composición farmacéutica descrita anteriormente, en la que una sustancia citotóxica se une al anticuerpo.

Preferiblemente, la sustancia citotóxica es un fármaco, una toxina o una sustancia radiactiva.

35 Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención es para su uso en el tratamiento de cáncer.

Preferiblemente, el cáncer es un cáncer sólido o un cáncer de la sangre.

40 Preferiblemente, el cáncer sólido es cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer hepático, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de piel.

45 Preferiblemente, el cáncer de la sangre es leucemia, linfoma o mieloma.

Más preferiblemente, el cáncer de la sangre es leucemia de células T del adulto (ATL).

50 Según la presente divulgación, se proporciona además un método para inhibir o tratar cáncer, que comprende administrar el anticuerpo descrito anteriormente de la presente invención a un sujeto.

Según la presente invención, se proporciona además el uso del anticuerpo descrito anteriormente de la presente invención para la producción de una composición farmacéutica o un agente anticancerígeno.

55 **Efectos ventajosos de la invención**

60 El anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo humano completo que reconoce específicamente TfR humano e inhibe la supervivencia o el crecimiento de células cancerosas que expresan TfR. Cuando se administra un anticuerpo humano a un humano, la antigenicidad del anticuerpo se reduce significativamente y, de ese modo, no se genera HAMA. Por tanto, el anticuerpo humano puede presentar una alta acción antitumoral, lo que provoca escasos efectos secundarios. Es decir, el anticuerpo anti-TfR humano de la presente invención es útil como agente anticancerígeno.

Breve descripción de los dibujos

65 [Figura 1] La figura 1 muestra los resultados de citometría de flujo usando la reacción de cada uno de los anticuerpos anti-TfR006 modificados con la línea de células de leucemia K562.

[Figura 2] La figura 2 muestra los efectos de cada uno de los anticuerpos anti-TfR006 modificados para inhibir el crecimiento de células K562.

5 [Figura 3] La figura 3 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos VH (SEQ ID NO: 43) de un anticuerpo TfR006, la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 44) de IGHV3-30 y la secuencia de aminoácidos de consenso (SEQ ID NO: 45) del subgrupo III de genes de la línea germinal humana.

10 [Figura 4] La figura 4 muestra los efectos de anticuerpos anti-TfR006 modificados para inhibir el crecimiento tumoral en modelos de ATL.

[Figura 5] La figura 5 muestra los efectos de anticuerpos anti-TfR006 modificados para inhibir el crecimiento tumoral en modelos de ATL.

15 [Figura 6] La figura 6 muestra los efectos de anticuerpos anti-TfR006 modificados para inhibir el crecimiento tumoral en modelos de leucemia.

[Figura 7] La figura 7 muestra los efectos de anticuerpos anti-TfR006 modificados para inhibir el crecimiento tumoral en modelos de leucemia.

20 [Figura 8] La figura 8 muestra los efectos de anticuerpos anti-TfR006 modificados para inhibir el crecimiento tumoral en modelos de leucemia.

[Figura 9] La figura 9 muestra los efectos de anticuerpos anti-TfR006 modificados para inhibir el crecimiento tumoral en modelos de cáncer sólido.

25 [Figura 10] La figura 10 muestra los efectos de ELISA antígeno-anticuerpo de anticuerpos anti-TfR006 modificados y anticuerpos previos.

30 [Figura 11] La figura 11 muestra los resultados comparativos de los efectos medicinales *in vivo* de anticuerpos anti-TfR006 modificados y anticuerpos previos.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

35 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle.

Definiciones y técnicas generales

40 A menos que se especifique lo contrario en la presente descripción, los términos científicos usados respecto a la presente invención tienen los significados que entiende generalmente un experto en la técnica. En general, las nomenclaturas y técnicas aplicadas al cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química de proteínas y de ácidos nucleicos, e hibridación, que se describen en la presente descripción, se conocen bien en el presente campo técnico y, por tanto, se usan comúnmente.

45 Los métodos y técnicas de la presente invención se llevan a cabo según métodos convencionales que se conocen bien en el presente campo técnico, de tales formas tal como se describe en una variedad de documentos de referencia general citados y comentados en toda la presente descripción y en documentos de referencia más específicos, a menos que se especifique lo contrario.

50 TfR

El receptor de transferrina (TfR) humano es una proteína transmembrana de un solo paso (SEQ ID NO: 51) que comprende 760 aminoácidos y está codificada por el cromosoma humano 3. Esta proteína también se ha conocido como antígeno CD71 y se considera que esta proteína está asociada con la incorporación de hierro en células y con el crecimiento celular. El TfR de la presente invención no está particularmente limitado en cuanto a la estructura. Por tanto, el TfR humano incluye todos de un monómero, un polímero, una forma intacta expresada sobre una membrana celular, una forma soluble constituida en una región extracelular, una forma truncada, una forma de mutación provocada por una mutación genética, delección, etc. y una forma que ha experimentado modificación posttraduccional mediante fosforilación o similar.

60 Reaccionar y reactividad

Los términos "reaccionar" y "reactividad" tienen los mismos significados en la presente descripción, a menos que se especifique lo contrario. Es decir, estos términos significan que un anticuerpo reconoce un antígeno. El antígeno usado en el presente documento puede ser de cualquiera de un TfR intacto expresado sobre una membrana celular, una forma truncada y una forma soluble. Además, el antígeno puede ser o bien un TfR que tiene una estructura

tridimensional o bien un Tfr desnaturalizado. Los ejemplos de medios para examinar la reactividad incluyen citometría de flujo (FACS), ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), inmunotransferencia de tipo Western, técnica de medición de microfluorescencia (FMAT), resonancia de plasmón superficial (Biacore), inmunotinción e inmunoprecipitación.

El anticuerpo usado en citometría de flujo puede ser o bien un anticuerpo marcado con una sustancia fluorescente tal como FITC o con biotina, o bien un anticuerpo no marcado. Se usa una avidina marcada de manera fluorescente, un anticuerpo anti-inmoglobulina humana marcado de manera fluorescente o similar, según la presencia o ausencia de marcaje del anticuerpo usado y el tipo del mismo. La reactividad puede evaluarse añadiendo una cantidad suficiente de anticuerpo anti-Tfr (que tiene generalmente una concentración final de 0,01 a 10 µg/ml) a un analito y después comparando la reactividad obtenida con la reactividad con un anticuerpo de control negativo o un anticuerpo de control positivo.

Anticuerpo

En la presente descripción se usan las siguientes abreviaturas (entre paréntesis) según las costumbres, según sea necesario.

Cadena pesada (cadena H), cadena ligera (cadena L), región variable de cadena pesada (VH), región variable de cadena ligera (VL), región determinante de complementariedad (CDR), primera región determinante de complementariedad (CDR1), segunda región determinante de complementariedad (CDR2), tercera región determinante de complementariedad (CDR3), primera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR1 de VH), segunda región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR2 de VH), tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR3 de VH), primera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR1 de VL), segunda región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR2 de VL) y tercera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR3 de VL).

En la presente descripción, el término "anticuerpo" tiene las mismas definiciones que inmoglobulina, y debe entenderse como generalmente conocido en el presente campo técnico. Específicamente, el término "anticuerpo" no está limitado a ningún método específico dado para producir el anticuerpo. Por ejemplo, el término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal.

En la presente descripción, el término "anticuerpo humano" se usa para significar cualquier anticuerpo dado, en el que las secuencias de una región variable y una región constante son secuencias humanas. Este término incluye anticuerpos que tienen secuencias humanas y están modificadas, por ejemplo, para eliminar cisteína que puede provocar una posible disminución de la inmunogenicidad, un aumento de la afinidad y un plegamiento no deseable. Este término también incluye anticuerpos generados en células no humanas mediante recombinación, que permiten glicosilación que no es específica para células humanas. Estos anticuerpos pueden prepararse de diversas formas.

En la presente descripción, el término "anticuerpo humanizado" significa un anticuerpo derivado de no humano, en el que residuos de aminoácido característicos de una secuencia de anticuerpo no humano se sustituyen por residuos encontrados en posiciones correspondientes a las de un anticuerpo humano. Se considera que este procedimiento de "humanización" reduce la inmunogenicidad del anticuerpo obtenido en humanos. Se entendería que un anticuerpo derivado de no humano puede humanizarse usando una técnica bien conocida en el presente campo técnico. Remítase a, por ejemplo, Winter *et al.*, Immunol. Today 14: 43-46 (1993). El anticuerpo diana puede prepararse mediante un enfoque de ingeniería genética por medio de una técnica de ADN de recombinación de sustitución de CH1, CH2, CH3, un dominio bisagra y/o un dominio de región estructural por los de la secuencia humana correspondiente. Remítase, por ejemplo, al documento WO92/02190 y a las patentes estadounidenses n.ºs 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 y 5.777.085. En la presente descripción, el término "anticuerpo humanizado" incluye un anticuerpo humano quimérico y un anticuerpo injertado con CDR dentro de las definiciones del mismo.

La secuencia de una región estructural (FR) en una región variable del anticuerpo de la presente invención no está particularmente limitada, a menos que afecte sustancialmente a la capacidad de unión específica del anticuerpo al antígeno correspondiente. La región FR de un anticuerpo humano se usa preferiblemente, pero también es posible usar regiones FR de especies animales distintas de humanos (por ejemplo un ratón, una rata, etc.).

En la presente descripción, el término "anticuerpo de fago" se usa para significar un anticuerpo scFv generado a partir del fago. Es decir, el anticuerpo de fago es un fragmento de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VH y VL. Este fragmento puede comprender una secuencia de aminoácidos que actúa como marcador, así como aminoácidos que actúan como conector.

En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención comprende una región constante así como una región variable (por ejemplo, anticuerpo IgG). La secuencia de la región constante no está particularmente limitada. Por ejemplo, puede usarse la región constante de un anticuerpo humano conocido. La región constante de cadena pesada (CH) de un anticuerpo humano no está particularmente limitada, siempre que pertenezca a una inmoglobulina humana (a continuación en el presente documento denominado "hIgG"). Son preferibles las de la clase hIgG y puede usarse

una cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase hIgG, tales como hIgG1, hIgG2, hIgG3 o hIgG4. Por otro lado, la región constante de cadena ligera (CL) no está particularmente limitada, siempre que pertenezca a hIg, y pueden usarse las de la clase κ o λ . Además, también pueden usarse regiones constantes de especies animales distintas de humanos (por ejemplo, un ratón o una rata).

5 En la presente descripción, el término “cuerpo modificado” o “anticuerpo modificado” se usa para significar que la secuencia de aminoácidos de la región variable (secuencias de CDR y/o secuencias de FR) de un anticuerpo original comprende una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o múltiples aminoácidos. El “anticuerpo original” significa un anticuerpo TfR006 que tiene una VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 46. En la secuencia de aminoácidos se delecionan, se añaden, se sustituyen y/o se insertan uno o varios (por ejemplo, de 1 a 8, preferiblemente de 1 a 5, más preferiblemente de 1 a 3, y de manera particularmente preferible 1 ó 2) aminoácidos. Como método de preparación de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene una capacidad de unión a TfR y/o una actividad antitumoral, que ha conocido bien un experto en la técnica, se ha conocido un método de introducción de una mutación en una proteína. Por ejemplo, tal experto podría preparar un anticuerpo mutante funcionalmente equivalente a un anticuerpo que tiene una actividad de unión a TfR y/o una actividad antitumoral introduciendo adecuadamente una mutación en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo que tiene una actividad de unión a TfR y/o una actividad antitumoral según una mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y y Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275; Zoller, MJ y Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M y Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer W y Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA. *Methods. Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492).

En la presente descripción, la frase “una actividad equivalente a la actividad del anticuerpo original” se usa para significar que la actividad de unión a TfR humano y/o actividad antitumoral de un determinado anticuerpo son equivalentes a las del anticuerpo original del mismo. El término “equivalente” no significa necesariamente el mismo nivel de actividad. La actividad puede aumentarse, o la actividad también puede disminuirse, siempre que el anticuerpo tenga la actividad. Un anticuerpo que tiene una actividad disminuida puede ser un anticuerpo que tiene una actividad que es, por ejemplo, del 30% o más, preferiblemente el 50% o más, más preferiblemente el 80% o más, además preferiblemente el 90% o más, y de manera particularmente preferible el 95% o más de la actividad del anticuerpo original.

El término “actividad de unión” significa la actividad de un anticuerpo para reconocer un antígeno. Este antígeno puede ser un TfR intacto expresado sobre una membrana celular, una forma truncada o una forma soluble. Además, el antígeno puede ser o bien un TfR que tiene una estructura tridimensional o bien un TfR desnaturalizado. Los ejemplos de medios para examinar la actividad de unión incluyen citometría de flujo (FACS), ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), inmunotransferencia de tipo Western, técnica de medición de microfluorescencia (FMAT) y resonancia de plasmón superficial (Biacore).

El término “actividad antitumoral” significa la actividad de inhibición del crecimiento o supervivencia de células tumorales. La inhibición del crecimiento o de la supervivencia de células tumorales puede tener lugar o bien *in vitro* o bien *in vivo*. Los ejemplos de la actividad antitumoral *in vitro* incluyen una actividad de disminución del número de células tumorales, una actividad de inhibición de un aumento del número de células tumorales, una actividad de provocación de muerte celular a células tumorales, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Los ejemplos de la actividad antitumoral *in vivo* incluyen una actividad de disminución del peso o volumen de un tumor, una actividad de inhibición de un aumento del peso o volumen tumoral, una actividad de promoción de una disminución del peso o volumen tumoral mediante otro fármaco y una actividad de inhibición de la muerte de individuos provocada por células tumorales.

Los ejemplos de un modelo animal *in vivo* incluyen: un modelo de xenoinjerto preparado trasplantando una línea celular cultivada derivada de tejido de cáncer humano en un ratón inmunodeficiente tal como un ratón desnudo; y un modelo de injerto singénico preparado trasplantando una línea celular de cáncer de ratón cultivada en un ratón de tipo natural que tiene un sistema inmunitario normal.

Puede producirse un modelo de xenoinjerto trasplantando una línea celular de cáncer humano en diversos sitios de ratones inmunodeficientes tales como un ratón desnudo, incluyendo la hipodermis, el sitio intradérmico, la cavidad abdominal o una vena.

El anticuerpo mencionado anteriormente de la divulgación puede comprender una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o múltiples aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de una región variable (una secuencia de CDR y/o una secuencia de FR), siempre que tenga una actividad de unión a TfR o una actividad antitumoral que es equivalente a la del anticuerpo original. Como método para preparar un anticuerpo que tiene una

actividad de unión a TfR y/o una actividad antitumoral, que comprende una delección, adición, sustitución y/o inserción de uno o varios aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 8, preferiblemente de 1 a 5, más preferiblemente de 1 a 3, y de manera particularmente preferible 1 o 2 aminoácidos), un método de introducción de una mutación en una proteína es bien conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, tal experto podría preparar un anticuerpo mutante funcionalmente equivalente a un anticuerpo que tiene una actividad de unión a TfR y/o una actividad antitumoral introduciendo adecuadamente una mutación en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo que tiene una actividad de unión a TfR y/o una actividad antitumoral según una mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y y Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxiribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275; Zoller, MJ y Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, H W, Kramer, B, Pflugfelder, M y Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer W y Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492), etc.

Como tal, un anticuerpo, que comprende una mutación de uno o varios aminoácidos en una región variable del mismo y tiene una actividad de unión a TfR y/o una actividad antitumoral, también se incluye en el anticuerpo de la presente divulgación.

El anticuerpo de la presente invención no está limitado por su origen y puede ser un anticuerpo derivado de cualquier animal, tal como un anticuerpo humano, un anticuerpo de ratón o un anticuerpo de rata. Además, el presente anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En un aspecto preferido, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano.

Los anticuerpos de la presente invención se definen en las reivindicaciones y pueden ser diferentes entre sí en cuanto a secuencia de aminoácidos, peso molecular, punto isoelectrico, la presencia o ausencia de una cadena de azúcar o la forma de la misma, etc., según las células o huéspedes mencionados anteriormente que generan los anticuerpos, o un método de purificación. Por ejemplo, un anticuerpo que experimenta una modificación después de que se haya traducido a la secuencia de aminoácidos descrita en la presente descripción también se incluye en la presente invención. Además, un anticuerpo que ha experimentado una modificación postraduccional en un sitio distinto de aquellos para la modificación postraduccional conocida también se incluye en la presente invención, siempre que tenga una actividad equivalente a la del anticuerpo de la presente invención. Además, cuando se permite que el anticuerpo de la presente invención se exprese en células procariontas tales como *Escherichia coli*, se añade un residuo metionina al extremo N de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original. El anticuerpo de la presente invención también incluye un anticuerpo de este tipo. Un anticuerpo que ha experimentado una modificación postraduccional en un sitio distinto de aquellos para la modificación postraduccional conocida también se incluye en la presente invención, siempre que tenga una actividad equivalente a la del anticuerpo de la presente invención.

Producción de anticuerpo

(1) Producción de scFv que reacciona con antígeno usando biblioteca de presentación de fagos

El anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante varios métodos conocidos en el presente campo técnico. Por ejemplo, usando una técnica de presentación de fagos, puede proporcionarse una biblioteca que comprende un repertorio de anticuerpos que tienen diversa afinidad por TfR. Posteriormente, puede cribarse una biblioteca de este tipo para identificar y aislar anticuerpos contra TfR. Preferiblemente, la biblioteca de fagos es una biblioteca de presentación de fagos scFv que se genera usando ADNc de VL y VH humano que se ha preparado a partir de ARNm aislado de células B humanas. En el presente campo técnico se conoce un método de preparación y cribado de una biblioteca de este tipo. Se recupera una sustancia genética a partir de clones de fagos que presentan reactividad que se han seleccionado usando un TfR humano como antígeno. Analizando el gen de fago seleccionado, pueden determinarse las secuencias de ADN de VH y VL que codifican para la región variable de un anticuerpo humano que se une al antígeno. Usando esta secuencia de scFv, se prepara IgG a partir de scFv para obtener un anticuerpo humano.

(2) Preparación de IgG a partir de scFv (preparación de anticuerpo humano)

Se construye un vector de expresión de cadena H o cadena L y después se permite que se exprese en una célula huésped. Después de eso, el sobrenadante que contiene proteína secretada se recupera y después se purifica para obtener un anticuerpo humano. Alternativamente, también puede obtenerse un anticuerpo humano de este tipo permitiendo que VH y VL se expresen en un solo vector (tipo tándem). Estos métodos se conocen bien y pueden llevarse a cabo con referencia a los documentos WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438, WO95/15388, WO97/10354, etc.

Específicamente, se conecta ADN que codifica para VH con otra molécula de ADN que codifica para una región

constante de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3), para obtener un gen de cadena pesada de longitud completa. La secuencia de un gen de región constante de cadena pesada humano se conoce en el presente campo técnico (por ejemplo, Kabat, E. A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación de NIH n.º 91-3242) y puede obtenerse un fragmento de ADN que incluye una región de este tipo mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser la región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. La región constante más preferida es la de IgG1 o IgG2. La secuencia de región constante de IgG1 puede incluir cualquier alelo o alotipo que se sabe que se generan entre diferentes individuos, tales como Gm (1), Gm (2), Gm (3) o Gm (17). Estos alotipos corresponden a una sustitución de aminoácidos que se producen de manera natural en la región constante de IgG1.

Se conecta ADN que codifica para VL con otra molécula de ADN que codifica para la región constante de cadena ligera CL, para obtener un gen de cadena L de longitud completa (y un gen de cadena ligera Fab). La secuencia de un gen de región constante de cadena ligera humano se conoce en el presente campo técnico (por ejemplo, Kabat, E. A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación de NIH n.º 91-3242) y puede obtenerse un fragmento de ADN que incluye una región de este tipo mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser la región constante de κ o λ . La región constante de κ puede incluir cualquier alelo conocido que va a generarse entre diferentes individuos, tales como Inv (1), Inv (2) o Inv (3). La región constante de λ puede derivar de uno cualquiera de los tres genes λ .

El ADN así obtenido que codifica para una cadena H o cadena L se inserta en un vector para construir un vector de expresión y después se permite que el vector de expresión construido se exprese en una célula huésped. Después de eso, el sobrenadante que contiene proteína secretada se recupera y se purifica para obtener un anticuerpo humano. Los ejemplos del vector de expresión incluyen un plásmido, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), fitovirus tales como virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco, un cósmido, YAC y episoma derivado de EBV. Se seleccionan un vector de expresión y una secuencia reguladora de la expresión, de modo que sean adecuados para una célula huésped usada para expresión. Pueden insertarse un gen de cadena ligera de anticuerpo y un gen de cadena pesada de anticuerpo en diferentes vectores, o también pueden insertarse los dos genes en un solo vector de expresión. Se inserta un gen de anticuerpo en un vector de expresión mediante un método convencional (por ejemplo, conexión de un sitio de restricción complementario sobre un fragmento de gen de anticuerpo con un vector, o conexión de extremos romos aplicada cuando no están presentes sitios de restricción).

Un vector favorable codifica para una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana completada funcionalmente que tiene un sitio de restricción adecuado, que se ha construido mediante un enfoque de ingeniería genética de modo que cualquier secuencia VH o VL dada puede insertarse fácilmente y después expresarse tal como se describió anteriormente. En un vector de este tipo, el corte y empalme tiene lugar generalmente entre un sitio donante de corte y empalme en la región J insertada y un sitio aceptor de corte y empalme que precede un dominio C humano, o tal corte y empalme también tiene lugar en una región de corte y empalme que existe en un exón de CH humano. La poliadenilación y la terminación de la transcripción tienen lugar en un sitio cromosómico natural en dirección 3' de una región codificante. Un vector de expresión recombinante también puede codificar para un péptido señal que promueve la secreción de una cadena de anticuerpo derivada de una célula huésped. Un gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en un vector, de modo que puede conectarse un péptido señal en marco con el extremo amino de una cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser o bien un péptido señal de inmunoglobulina o bien un péptido señal heterogéneo (concretamente, puede ser un péptido señal derivado de proteína distinta a inmunoglobulina).

Un vector de expresión usado para el anticuerpo de la presente invención también puede tener secuencias tales como una secuencia para regular la replicación del vector en una célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación) o una secuencia de gen marcador selectivo, así como un gen de anticuerpo y una secuencia reguladora. El gen marcador selectivo promueve la selección de una célula huésped en la que se ha introducido un vector. Por ejemplo, el marcador selectivo imparte generalmente resistencia a fármacos tales como G418, higromicina o metotrexato a una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores selectivos preferidos incluyen un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (usado en la selección/amplificación mediante metotrexato como dhfr-célula huésped), un gen de neomicina fosfotransferasa (usado en la selección mediante G418) y un gen de glutamato sintasa.

Una célula huésped se transforma con un vector de expresión de gen de anticuerpo construido mediante el método descrito anteriormente. Puede usarse cualquier tipo de célula como célula huésped, siempre que pueda generar el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de una célula huésped de este tipo incluyen bacterias, levaduras, células animales, células de insecto y células vegetales. Entre estas células, las células animales son preferibles. Los ejemplos de las células animales incluyen células de ovario de hámster chino CHO/dhfr(-) y CHO/DG44, células derivadas de mono COS (A. Wright & S. L. Morrison, J. Immunol. 160, 3393-3402 (1998)) y células SP2/O (mieloma de ratón) (K. Motmans *et al.*, Eur. J. Cancer Prev. 5,512-5199 (1996); R. P. Junghans *et al.*, Cancer Res. 50, 1495-1502 (1990)). Para la transformación, se aplican preferiblemente un método de lipofectina (R. W. Malone *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6007 (1989); P. L. Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413 (1987)), un método de

electroporación, un método de fosfato de calcio (F. L. Graham & A. J. van der Eb, Virology 52,456-467 (1973)), un método de DEAE-dextrano y similares.

5 Se cultiva un transformante y entonces se separa un anticuerpo humano de las células del transformante o un medio de cultivo del mismo. Para la separación/purificación del anticuerpo pueden usarse adecuadamente métodos tales como centrifugación, fraccionamiento con sulfato de amonio, precipitación por adición de sal, ultrafiltración, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel combinándolos adecuadamente.

10 Fragmentos de anticuerpo

Puede prepararse un fragmento de anticuerpo basándose en el anticuerpo de la presente invención, o basándose en la información de secuencia de un gen que codifica para el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos del fragmento de anticuerpo incluyen anticuerpos Fab, Fab', F(ab')₂, scFv y dsFv.

15 Se obtiene Fab digiriendo IgG mediante papaína en presencia de cisteína. Es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50 000, que está constituido por regiones variables de cadena L y cadena H y un fragmento de cadena H que consiste en un dominio CH1 y una porción de una región bisagra. En la presente invención puede obtenerse Fab digiriendo el anticuerpo descrito anteriormente mediante papaína. Además, también puede prepararse Fab incorporando ADN que codifica para una porción de la cadena H y la cadena L del anticuerpo descrito anteriormente en un vector adecuado, realizando entonces transformación con el vector resultante y obteniendo entonces Fab a partir del transformante.

25 Fab' es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50 000 que se obtiene escindiendo un enlace disulfuro entre las cadenas H del F(ab')₂ mencionado a continuación. En la presente invención, puede obtenerse Fab' digiriendo el anticuerpo descrito anteriormente mediante pepsina y después escindiendo un enlace disulfuro con un agente reductor. Además, como con Fab, también puede prepararse Fab' mediante modificación por ingeniería genética usando ADN que codifica para el Fab'.

30 F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 100 000 que se obtiene digiriendo IgG mediante pepsina, en el que un fragmento (Fab') constituido por regiones variables de cadena L y cadena H y un fragmento de cadena H que consiste en un dominio CH1 y una porción de una región bisagra se une al otro fragmento (Fab') por medio de un enlace disulfuro. En la presente invención, puede obtenerse F(ab')₂ digiriendo el anticuerpo descrito anteriormente mediante pepsina. Además, como con Fab, F(ab')₂ también puede prepararse mediante modificación por ingeniería genética usando ADN que codifica para el F(ab')₂.

35 scFv es un fragmento de anticuerpo obtenido conectando el extremo C de una cadena de Fv que consiste en una región variable de cadena H y una región variable de cadena L con el extremo N de la otra cadena de los mismos, usando un conector peptídico adecuado para formar una cadena sencilla. Puede usarse (GGGGS)₃ que tiene alta flexibilidad, por ejemplo, como un conector peptídico de este tipo. Por ejemplo, se usa ADN que codifica para la región variable de cadena H y la región variable de cadena L del anticuerpo descrito anteriormente y ADN que codifica para un conector peptídico para construir ADN que codifica para un anticuerpo scFv, y el ADN así construido se incorpora entonces en un vector adecuado. Después de eso, puede prepararse scFv a partir de un transformante obtenido mediante transformación con el vector mencionado anteriormente.

45 dsFv es un fragmento de Fv obtenido introduciendo un residuo Cys en un sitio adecuado en cada una de una región variable de cadena H y una región variable de cadena L y estabilizando después la región variable de cadena H y la región variable de cadena L mediante un enlace disulfuro. El sitio en cada cadena en el que el residuo Cys va a introducirse puede determinarse basándose en una conformación predicha mediante modelado molecular. En la presente invención, por ejemplo, se predice una conformación a partir de las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena H y la región variable de cadena L del anticuerpo descrito anteriormente y se construye entonces ADN que codifica para cada una de la región variable de cadena H y la región variable de cadena L, en el que se ha introducido una mutación basándose en tal predicción. El ADN así construido se incorpora en un vector adecuado. Después de eso, puede prepararse dsFv a partir de un transformante obtenido mediante transformación con el vector mencionado anteriormente.

Además, también es posible conectar el anticuerpo scFv, el anticuerpo dcFv o similar usando un conector adecuado, o fusionar un fragmento de anticuerpo de este tipo con estreptavidina para multimerizar el fragmento de anticuerpo.

60 Composición farmacéutica

Según la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención. En una realización, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer, pero no se limita al mismo. También se incluyen en el alcance de la presente invención enfermedades provocadas por una expresión elevada de TfR, distintas de cáncer. En una realización más preferida, los ejemplos del cáncer incluyen: cáncer sólido (por ejemplo cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de

estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer hepático, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, etc.); y cáncer de la sangre (por ejemplo leucemia, linfoma, mieloma, etc.). En otra realización preferida de la presente invención, el cáncer es leucemia de células T del adulto (ATL).

En un aspecto de la composición farmacéutica de la presente invención, el anticuerpo de la presente invención se usa como principio activo. Se usan la actividad de inhibición de crecimiento celular, actividad de inducción de muerte celular, actividad ADCC, actividad CDC y similares del anticuerpo y, de ese modo, se presentan los efectos antitumorales del anticuerpo. El anticuerpo puede tener sólo una de las actividades mencionadas anteriormente, o puede tener simultáneamente una pluralidad de las actividades mencionadas anteriormente. Es decir, se usa un anticuerpo no marcado como principio activo de la composición farmacéutica.

En otro aspecto, el anticuerpo de la presente invención puede usarse como agente terapéutico contra el cáncer en una terapia de misiles que se dirige específicamente a tejidos cancerosos. Específicamente, la terapia de misiles es un método de tratamiento que comprende administrar a células cancerosas un anticuerpo al que se ha unido una sustancia que provoca daño a las células cancerosas y permitir que la sustancia se transfiera específicamente a la porción cancerosa, para abordar el logro de efectos terapéuticos y reducción de efectos secundarios.

Las sustancias que provocan daño a células cancerosas son sustancias citotóxicas tales como un fármaco, una toxina o una sustancia radiactiva. La unión de una sustancia citotóxica de este tipo al anticuerpo puede llevarse a cabo mediante un método conocido para un experto en la técnica (Clin Cancer Res. 1 de julio de 2004; 10(13): 4538-49).

Como fármaco que va a unirse al anticuerpo puede usarse una sustancia conocida que provoca daño a células cancerosas. Los ejemplos de un fármaco de este tipo incluyen duocarmicina, un análogo y un derivado de duocarmicina, CC-1065, un análogo de duocarmicina que comprende CBI como componente principal, un análogo de duocarmicina que comprende MCBI como componente principal, un análogo de duocarmicina que comprende CCBI como componente principal, doxorubicina, un conjugado de doxorubicina, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, dolastatina, dolestatina-10, combretastatina, calicheamicina, maitansina, un análogo de maitansina, DM1, DM2, DM3, DM4, DMI, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF), éster AE del ácido 5-benzoil valérico (AEVB), tubulisina, disorazol, epotilona, paclitaxel, docetaxel, SN-38, topotecán, rizoxina, equinomicina, colchicina, vinblastina, vindesina, estramustina, cemadotina, eleuterobina, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, arabinósido de citosina, melfalán, leurosina, leurosideoína, actinomicina, daunorubicina, un conjugado de daunorubicina, mitomicina C, mitomicina A, carminomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina, un derivado de podofilotoxina, etopósido, fosfato de etopósido, vincristina, taxol, Taxotere, ácido retinoico, ácido butírico, espermidina N⁸-acetilo y camptotecina, pero los ejemplos no se limitan a los mismos.

El anticuerpo puede unirse directamente a un fármaco por medio de un grupo conector que posee el mismo o similar, o puede unirse indirectamente entre sí por medio de un conector u otra sustancia.

Los ejemplos del uso de un grupo conector en la unión directa de un fármaco incluyen un enlace disulfuro usando un grupo SH y un enlace mediado por maleimida. Por ejemplo, se reducen un enlace disulfuro intramolecular en la región Fc del anticuerpo y un enlace disulfuro del fármaco y después se unen entre sí por medio de un enlace disulfuro. También existe un método que implica mediación de maleimida. Además, un método alternativo es un método de introducción de cisteína en el anticuerpo mediante modificación por ingeniería genética.

También es posible unir indirectamente el anticuerpo al fármaco por medio de otra sustancia (conector). El conector tiene de manera deseable uno o dos o más tipos de grupos funcionales que reaccionan con el anticuerpo o el fármaco, o con ambos. Los ejemplos de un grupo funcional de este tipo incluyen un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo mercapto, un grupo maleimido y un grupo piridinilo.

Los ejemplos del conector usado en el presente documento incluyen 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato) de N-succinimidilo (LC-SMCC), éster N-succinimidílico de ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster N-succinimidílico de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster N-hidroxisuccinimídico de ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimídico (MBS), éster N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimídico (AMAS), 6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato de succinimidilo (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)butilato de N-succinimidilo (SMPB), N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPPI), 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), p-aminobenciloxicarbonilo (PAB), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) y (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), pero los ejemplos no se limitan a los mismos. Además, el conector puede ser un conector peptídico tal como valina-citrulina (Val-Cit) o alanina-fenilalanina (ala-phe), o pueden combinarse apropiadamente y pueden usarse los conectores indicados anteriormente.

Con respecto a un método de unión de un fármaco a un anticuerpo, un fármaco de este tipo puede unirse a un anticuerpo según los métodos descritos, por ejemplo, en Cancer Research 68(22) 9280 (2008); Nature

Biotechnology 26(8) 925 (2008); Bio Conjugate Chemistry 19, 1673 (2008); Cancer Research 68(15) 6300 (2008); publicación de patente japonesa (Kohyo) n.º 2008-516896 A, etc.

5 La toxina puede ser la que se denomina inmunotoxina, en la que se permite que una toxina se una al anticuerpo de manera química o mediante modificación por ingeniería genética. Los ejemplos de la toxina incluyen cadena A de la toxina diftérica, endotoxina de *Pseudomonas*, cadena de la ricina, cadena A de la ricina sin cadena de azúcar, gelonina y saporina.

10 Como sustancia radiactiva usada en el presente documento puede usarse una sustancia radiactiva conocida para un experto en la técnica. Los ejemplos de una sustancia radiactiva de este tipo incluyen itrio 90 (^{90}Y), renio 186 (^{186}Re), renio 188 (^{188}Re), cobre 67 (^{67}Cu), hierro 59 (^{59}Fe), estroncio 89 (^{89}Sr), oro 198 (^{198}Au), mercurio 203 (^{203}Hg), plomo 212 (^{212}Pb), disprosio 165 (^{165}Dy), rutenio 103 (^{103}Ru), bismuto 212 (^{212}Bi), bismuto 213 (^{213}Bi), holmio 166 (^{166}Ho), samario 153 (^{153}Sm) y lutecio 177 (^{177}Lu). Las sustancias radiactivas preferidas son ^{90}Y , ^{153}Sm y ^{177}Lu .

15 La unión de una sustancia radiactiva de este tipo al anticuerpo puede llevarse a cabo mediante un método conocido para un experto en la técnica (Bioconjug Chem. marzo-abril de 1994; 5(2): 101-4).

20 Puede llevarse a cabo terapia contra el cáncer, que usa un anticuerpo al que se une un compuesto que contiene un radioisótopo, mediante un método conocido para un experto en la técnica (Bioconjug Chem. Noviembre-diciembre de 1998; 9(6): 773-82). Específicamente, al principio, se administra a un paciente un anticuerpo al que se ha unido un compuesto que contiene radioisótopo en una pequeña cantidad y se realiza entonces gammagrafía sobre todo el cuerpo del paciente. Se confirma que el nivel de unión de células de tejidos normales al anticuerpo es bajo y que el nivel de unión de células cancerosas al anticuerpo es alto. Después de eso, el anticuerpo al que se ha unido el compuesto que contiene radioisótopo se administra en una gran cantidad al paciente.

25 También se incluye en el alcance de la presente invención una preparación que comprende una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-TfR humano de la presente invención. Una preparación de este tipo comprende preferiblemente un diluyente o portador fisiológicamente aceptable, así como la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo. La preparación también puede ser una mezcla con otro anticuerpo, o con otro fármaco tal como un agente anticancerígeno. Los ejemplos de un portador adecuado usado en el presente documento incluyen una solución salina normal, una solución salina tamponada con fosfato, una solución salina con glucosa tamponada con fosfato y una solución salina tamponada, pero los ejemplos no se limitan a los mismos. De lo contrario, el anticuerpo se seca por congelación y, cuando se necesita, puede añadirse al mismo la disolución acuosa tamponada mencionada anteriormente para reconstituir el anticuerpo y entonces puede usarse el anticuerpo así reconstituido. Los ejemplos de la forma de dosificación de la preparación incluyen: administración oral, que usa un comprimido, una cápsula, un gránulo, un agente en polvo, un jarabe, etc.; y administración parenteral, que incluye inyecciones (inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, etc.), administración percutánea, administración transmucosa, administración transnasal, administración transpulmonar, el uso de un supositorio, etc. La preparación que comprende la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse sola, o puede usarse en combinación con otros fármacos.

45 La dosis aplicada de la composición farmacéutica de la presente invención es diferente según los síntomas, la edad, el peso corporal, etc. En general, en el caso de administración oral, la presente composición farmacéutica se administra en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a 1,000 mg al día por adulto, en cuanto a la cantidad de un anticuerpo contenido en la misma. Tal dosis puede administrarse una vez o dividirse en varias administraciones al día. Por otro lado, en el caso de administración parenteral, la presente composición farmacéutica puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a 1,000 mg para una única administración por medio de inyección subcutánea, inyección intramuscular o administración intravenosa.

50 La presente invención se describirá más en detalle en los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de la presente invención.

Ejemplos

55 Ejemplo 1: Selección de anticuerpo de fago usando una línea celular de cáncer

(1) Selección de anticuerpo de fago unido a células cancerosas (línea celular de cáncer hepático HepG2)

60 Se cultivaron células HepG2 en una placa de 15 cm y, después, usando 2 mg/ml de colagenasa I/tampón de disociación celular (Gibco BRL), se retiraron las células cultivadas de la placa. Se recuperaron las células y entonces se lavaron con PBS enfriado. Después de eso, se mezcló una biblioteca de fagos de anticuerpo humano (1×10^{13} ufc) con las células resultantes y entonces se añadió una disolución de reacción (BSA al 1%, NaN_3 al 0,1% y MEM) a la misma hasta un volumen final de 1,6 ml. Se rotó lentamente la mezcla obtenida a 4°C durante 4 horas para realizar una reacción. Tras la finalización de la reacción, se dividió la disolución de reacción en dos alícuotas, y se dispusieron en capa 0,6 ml de una disolución orgánica (ftalato de dibutilo y cicloheximida (9:1)) que se había preparado previamente sobre cada alícuota, y se centrifugó entonces la mezcla así preparada (300 rpm) durante 2

minutos usando una microcentrífuga. Después de eso, se descartó el sobrenadante y se suspendieron células precipitadas en el fondo del tubo en 0,7 ml de MEM/BSA al 1%. Entonces, se dispusieron en capa adicionalmente 0,7 ml de un disolvente orgánico sobre la suspensión. Se llevó a cabo centrifugación de la misma manera que la descrita anteriormente, entonces se descartó el sobrenadante y entonces se suspendieron las células en 0,3 ml de PBS, seguido por congelación con nitrógeno líquido (documento de patente 19, WO 2008/007648).

Se descongelaron las células congeladas a 37°C y después se infectaron con 20 ml de *Escherichia coli* DH12S (DO0.5) durante 1 hora. Se colocó la *Escherichia coli* infectada por fagos en 600 ml de un medio 2 x YTGA (2 x YT, 200 µg/ml de ampicisulfato y glucosa al 1%) y se cultivó entonces a 30°C durante la noche. Después de eso, se colocaron 10 ml del cultivo en 200 ml de un medio 2 x YTA (YT 2 x y 200 µg/ml de ampicisulfato) y se cultivó entonces a 37°C durante 1,5 horas. Entonces, se añadió fago auxiliar KO7 1×10^{11} al cultivo y se cultivó adicionalmente la mezcla obtenida a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 800 ml de un medio 2 x YTGAK (2 x YT, 200 µg/ml de ampicisulfato, glucosa al 0,05% y 50 µg/ml de kanamicina) al cultivo y entonces se cultivó la mezcla obtenida a 30°C durante la noche. Después de eso, se recuperó el sobrenadante mediante centrifugación (8000 rpm) durante 10 minutos. Al sobrenadante recuperado se le añadieron 200 ml de una disolución de PEG (polietilenglicol 6000 al 20% y NaCl 2,5 M) y se agitó completamente la mezcla obtenida. Después de eso, se sometió la mezcla de reacción a centrifugación (8000 rpm) durante 10 minutos para precipitar los fagos. Se suspendieron los fagos en 10 ml de PBS. La disolución obtenida se definió como fagos obtenidos de la 1ª selección.

Posteriormente, se llevó a cabo la 2ª selección. Se mezclaron las células cultivadas (2×10^7) con los fagos de la 1ª selección (1×10^{10}) y se añadió una disolución de reacción (BSA al 1%, NaN_3 al 0,1% y MEM) a la mezcla hasta un volumen final de 0,8 ml. Después de eso, se llevaron a cabo las mismas operaciones que en la 1ª selección mencionada anteriormente para obtener fagos de la 2ª selección.

Se llevó a cabo la 3ª selección usando los fagos (1×10^9) obtenidos de la 2ª selección de la misma manera que la descrita anteriormente.

(2) Análisis de anticuerpos de fagos

Se recuperaron los fagos obtenidos de la 3ª selección y se analizaron entonces las secuencias de ADN de los mismos mediante el método existente. Se retiraron los anticuerpos incompletos que comprendían deleciones en las regiones o los anticuerpos que tenían secuencias solapantes, de modo que pudieron obtenerse anticuerpos de fagos que tenían cada uno una secuencia de anticuerpo independiente (véase la patente japonesa n.º 4870348).

Mediante el mismo método, se seleccionaron anticuerpos de fagos que reaccionaban con antígenos contra el cáncer usando 21 tipos de células cancerosas mostradas en la siguiente tabla 1. Como resultado, se obtuvieron 1863 anticuerpos de fagos que tenían cada uno una secuencia independiente, tal como se muestra en la tabla 1.

[Tabla 1]

Tabla 1:

| Células cancerosas | Número de fagos obtenidos |
|--------------------|---------------------------|
| CO-2 | 102 |
| MKN45 | 90 |
| OCTH-16 | 82 |
| HepG2 | 410 |
| NCI-H441 | 80 |
| K562 | 33 |
| U937 | 107 |
| HL-60 | 107 |
| MV4-11 | 46 |
| KF28 | 62 |
| NCI-N87 | 50 |
| RERF-LC-AI | 73 |
| SW480 | 46 |
| MCF7 | 73 |
| LNCap.FGC | 60 |
| MDA-MB-231 | 78 |
| U-87MG | 62 |
| T98G | 71 |
| DU-145 | 96 |
| MMAc | 76 |
| G-361 | 59 |

Ejemplo 2: Selección de fagos que reaccionan con TfR humano soluble

(1) Producción de células que generan antígenos de TfR solubles

Usando las líneas celulares de cáncer MIAPaCa2 y SKOV-3, se preparó el ADNc de TfR mediante un método de PCR. Se preparó el ADNc de un dominio extracelular de TfR mediante un método ordinario y entonces se insertó el ADNc preparado en pCMV-Script (fabricado por Clontech) para construir un vector de expresión de antígeno de TfR soluble. Se introdujo este vector de expresión en una línea celular 293T para preparar células que generan un antígeno de TfR soluble.

(2) Selección de fagos positivos mediante ELISA

Se recuperó un sobrenadante de las células que generan TfR soluble descritas anteriormente y entonces se purificó para obtener un antígeno de TfR soluble. Usando este antígeno de TfR soluble, se examinó la reactividad de antígeno-anticuerpo mediante ELISA. Específicamente, se ajustó la concentración del antígeno de TfR soluble para que fuera de 10 µg/ml con PBS y después se añadió a Immuno Module/Strip Plates (NUNK) en una cantidad de 50 µl/pocillo. Se dejó reposar a 37°C durante 2 horas. Después de eso, se descartó el antígeno de TfR soluble y se añadió una disolución de bloqueo (leche desnatada al 5% / NaN₃ al 0,05% / PBS) al mismo en una cantidad de 200 µl/pocillo, seguido por la realización de bloqueo a 37°C durante 2 horas. Después de eso, se retiró la disolución de bloqueo y entonces se lavó la placa con PBS. Se añadió el sobrenadante del cultivo del fago mencionado anteriormente (tabla 1) a cada pocillo en una cantidad de 100 µl/pocillo y se hizo reaccionar a 37°C durante 1 hora. Se lavó la mezcla resultante con PBS cinco veces y entonces se añadió 1 µg/ml de anti-cp3 de conejo que se había diluido con PBS / Tween 20 al 0,05% a la mezcla resultante en una cantidad de 100 µl/pocillo. Se hizo reaccionar la mezcla así obtenida a 37°C durante 1 hora. Se lavó la mezcla resultante con PBS cinco veces y se añadió adicionalmente anti-IgG (H + L)-HRP de conejo que se había diluido 2000 veces con PBS / Tween 20 al 0,05% a la mezcla resultante en una cantidad de 100 µl/pocillo. Se hizo reaccionar la mezcla así obtenida a 37°C durante 1 hora. Se lavó la mezcla resultante con PBS cinco veces y entonces se añadió OPD en un tampón fosfato-citrato 0,1 M (pH 5,1) + H₂O₂ al 0,01% a la misma en una cantidad de 100 µl/pocillo. Se hizo reaccionar la mezcla obtenida a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de eso, se añadió 2NH₂SO₂ a la disolución de reacción en una cantidad de 100 µl/pocillo para terminar la reacción de coloración. Posteriormente, se midió la absorbancia a 492 nm usando SPECTRA max340PC (Molecular Devices). Como resultado, se encontraron veinte cepas de fagos que presentaban una reacción positiva significativa al antígeno de TfR soluble en las 1863 cepas de fagos. Se analizaron las secuencias de ADN de estas 20 cepas de fagos y, como resultado, se confirmó que todas sus secuencias de CDR eran nuevas. Entre estas secuencias de CDR, las secuencias de CDR del anticuerpo TfR006 son las siguientes.

TfR006

CDR1 de VH: SEQ ID NO: 1, CDR2 de VH: SEQ ID NO: 2, CDR3 de VH: SEQ ID NO: 3

CDR1 de VL: SEQ ID NO: 4, CDR2 de VL: SEQ ID NO: 5, CDR3 de VL: SEQ ID NO: 6

SEQ ID NO: 1: SYGMH

SEQ ID NO: 2: VISFDGSSKYYADSVKG

SEQ ID NO: 3: DSNFWSGYYSPPVDV

SEQ ID NO: 4: TRSSGSIASNSVQ

SEQ ID NO: 5: YEDTQRPS

SEQ ID NO: 6: QSYDSAYHWV

Ejemplo 3: Modificación de VH del anticuerpo TfR006

(1) Sustitución de un aminoácido en la secuencia de CDR3 de VH del anticuerpo TfR006

Se sustituyeron cada uno de los n.^{os} de Kabat 96, 97, 98 y 100 de la CDR3 (SEQ ID NO: 3) de la VH (SEQ ID NO: 43) de un anticuerpo TfR006 por otros aminoácidos. Se mutó el anticuerpo TfR006 de modo que se cambió el aminoácido de n.^o de Kabat 96 en la VH de un anticuerpo TfR402 modificado de S a G (SEQ ID NO: 7), se cambió el aminoácido de n.^o de Kabat 97 en la VH de un anticuerpo TfR403 de N a A (SEQ ID NO: 8), se cambió el aminoácido de n.^o de Kabat 98 en la VH de un anticuerpo TfR404 de F a L (SEQ ID NO: 9) y se cambió el aminoácido de n.^o de Kabat 100 en la VH de un anticuerpo TfR406 de S a G (SEQ ID NO: 10). Se muestran las

secuencias tras las sustituciones en la tabla 2. Además, se sustituyó Q de n.º de Kabat 1 en todos los cuerpos modificados por D, de modo que no pudo formarse el ácido piroglutámico N-terminal.

[Tabla 2]

5

Tabla 2: Secuencias de CDR3 de anticuerpos modificados

| | ...100.....102 | |
|----------------------|-----------------|---------------|
| n.º de Kabat | 567890abcdef12 | |
| CDR3 de HV de TfR006 | DSNFWSGYYSPVDV | SEQ ID NO: 3 |
| CDR3 de HV de TfR402 | DGNFWSGYYSPVDV | SEQ ID NO: 7 |
| CDR3 de HV de TfR403 | DSAFWSGGYYSPVDV | SEQ ID NO: 8 |
| CDR3 de HV de TfR404 | DSNLWSGGYYSPVDV | SEQ ID NO: 9 |
| CDR3 de HV de TfR406 | DSNFWGGYYSPVDV | SEQ ID NO: 10 |

(2) Sustitución de 3 aminoácidos en la secuencia de CDR3 de VH del anticuerpo TfR006

10

Se sustituyeron tres aminoácidos en la secuencia de CDR3 de VH de un anticuerpo TfR006 por otros aminoácidos para preparar un anticuerpo modificado. Se sustituyeron tres de seis aminoácidos que oscilaban entre los n.ºs de Kabat 95 y 100 en la CDR3 por otros aminoácidos. Se mutó la VH de un anticuerpo TfR407 de modo que implicó los n.ºs de Kabat N97A (en los que el 97º aminoácido N se sustituyó por A), F98L y S100G (SEQ ID NO: 11), se mutó la HV de un anticuerpo TfR408 de modo que implicó los n.ºs de Kabat S96G, F98L y S100G (SEQ ID NO: 12), se mutó la HV de un anticuerpo TfR409 de modo que implicó los n.ºs de Kabat S09G, N97A y S100G (SEQ ID NO: 13) y se mutó un TfR410 de modo que implicó los n.ºs de Kabat S96G, N97A y F98L (SEQ ID NO: 14) (tabla 3). Además, se sustituyó Q de n.º de Kabat 1 en todos los cuerpos modificados por D, de modo que no pudo formarse el ácido piroglutámico N-terminal.

15

20

[Tabla 3]

Tabla 3: Secuencias de CDR3 de anticuerpos modificados

| | ...100.....102 | |
|----------------------|-----------------|---------------|
| n.º de Kabat | 567890abcdef12 | |
| CDR3 de HV de TfR006 | DSNFWSGYYSPVDV | SEQ ID NO: 3 |
| CDR3 de HV de TfR407 | DSALWGGYYSPVDV | SEQ ID NO: 11 |
| CDR3 de HV de TfR408 | DGNLWGGYYSPVDV | SEQ ID NO: 12 |
| CDR3 de HV de TfR409 | DGAFWGGYYSPVDV | SEQ ID NO: 13 |
| CDR3 de HV de TfR410 | DGALWSGGYYSPVDV | SEQ ID NO: 14 |

25

(3) Sustitución de 4 aminoácidos en la secuencia de CDR3 de VH del anticuerpo TfR006

Se sustituyeron cuatro aminoácidos en la secuencia de CDR3 de VH de un anticuerpo TfR006 por otros aminoácidos para preparar un anticuerpo TfR411 modificado. Se mutaron cuatro de seis aminoácidos que oscilaban entre los n.ºs de Kabat 95 y 100 en la CDR3 de modo que implicaron los n.ºs de Kabat S96G, N97A, F98L y S100G (SEQ ID NO: 15) (tabla 4). Además, se sustituyó Q de n.º de Kabat 1 en este cuerpo modificado por D, de modo que no pudo formarse el ácido piroglutámico N-terminal.

30

35

[Tabla 4]

Tabla 4: Secuencia de CDR3 de anticuerpo modificado

| | ...100.....102 | |
|----------------------|----------------|---------------|
| n.º de Kabat | 567890abcdef12 | |
| CDR3 de HV de TfR006 | DSNFWSGYYSPVDV | SEQ ID NO: 3 |
| CDR3 de HV de TfR411 | DGALWGGYYSPVDV | SEQ ID NO: 15 |

(4) Sustitución de aminoácidos en la secuencia de CDR2 de VH del anticuerpo TfR006

40

Se sustituyeron aminoácidos en la secuencia de CDR2 de VH de un anticuerpo TfR006 por otros aminoácidos para preparar anticuerpos modificados. Las modificaciones realizadas se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 5]

45

Tabla 5: Secuencias de CDR2 de anticuerpos modificados

| | | |
|---------------------|-------------------|---------------|
| | 50.....65 | |
| n.º de Kabat | 012a3456789012345 | |
| CR2 de HV de Tfr006 | VISFDGSSKYYADSVKG | SEQ ID NO: 2 |
| CR2 de HV de Tfr434 | VISYDGSSKYYADSVKG | SEQ ID NO: 52 |
| CR2 de HV de Tfr435 | VISFDGSNKYYADSVKG | SEQ ID NO: 53 |
| CR2 de HV de Tfr436 | VISYDGSNKYYADSVKG | SEQ ID NO: 54 |

(5) Otras modificaciones de VH del anticuerpo Tfr006

5 Se examinó un gen de la línea germinal que es el más próximo a la secuencia de aminoácidos de la VH de un anticuerpo Tfr006 mediante búsqueda en la bases de datos de IMGT. Como resultado, se encontró que el gen de la línea germinal más próximo era IGHV3-30. La figura 3 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de VH (SEQ ID NO: 43) de un anticuerpo Tfr006, la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 44) de IGHV3-30 y la secuencia de aminoácidos de consenso (SEQ ID NO: 45) de un subgrupo III de genes de la línea germinal humana. Se prepararon mutantes de VH de Tfr006 que tenían cada uno diferentes combinaciones de aminoácidos que oscilaron entre VH de Tfr412 (SEQ ID NO: 16) y VH de Tfr420 (SEQ ID NO: 24).

10 SEQ ID NO: 16: VH de Tfr412

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFKSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSSRY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGALWGGYYSPVDVWGQGT
LTVVS

15 SEQ ID NO: 17: VH de Tfr413

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFKSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGALWGGYYSPVDVWGQGT
LTVVSS

20 SEQ ID NO: 18: VH de Tfr414

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFKSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGALWGGYYSPVDVWGQGT
LTVVSS

25 SEQ ID NO: 19: VH de Tfr415

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFKSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSSRY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGALWGGYYSPVDVWGQGT
LTVVSS

30 SEQ ID NO: 20: VH de Tfr416

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFKSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSSRY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGALWGGYYSPVDVWGQGT
LTVVSS

35 SEQ ID NO: 21: VH de Tfr417

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMQWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSSRY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGALWGGYYSPVDVWGQGT
LTVVSS

SEQ ID NO: 22: VH de Tfr418

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVISFDGGSRY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGALWGGYYSPVDVWGQGT
 LVTVSS

SEQ ID NO: 23: VH de Tfr419

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMQWVRQAPGKGLEWVSVISFDGGNRY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGALWGGYYSPVDVWGQGT
 5 LVTVSS

SEQ ID NO: 24: VH de Tfr420

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMQWVRQAPGKGLEWVSVISFDGGNRY
 YADSIKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGALWGGYYSPIDVWGQGT
 10 LVTVSS

SEQ ID NO: 43: VH de Tfr006

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFPFKSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSSK
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDSNFWSGYYSPVDVWGQG
 TTVTSS

SEQ ID NO: 44: IGHV3-30

QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

SEQ ID NO: 45: consenso de VH3 humana

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGGSTY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

Ejemplo 4: Modificación de VL del anticuerpo Tfr006

(1) Modificación de VL del anticuerpo Tfr006

Se buscó un gen de la línea germinal que se estimó que se usaba en VL de Tfr006 (SEQ ID NO: 46) en la base de datos de IMGT. Como resultado, se encontró que era IGLV6-57 (n.º de registro: Z73673, SEQ ID NO: 47) (tabla 6). Se encontró sustitución de aminoácidos en 5 sitios en la porción génica de VL y, basándose en esto, se prepararon cuerpos modificados de VL del anticuerpo Tfr006, Tfr421 y Tfr422 (Tfr421: SEQ ID NO: 25 y Tfr422: SEQ ID NO: 26). Además, se sustituyó Q de n.º de Kabat 1 en un cuerpo modificado de este tipo por D, de modo que no pudo formarse el ácido piroglutámico N-terminal.

[Tabla 6]

Tabla 6: Gen de la línea germinal Tfr006

| | | | |
|----|---------------------|-------|---------|
| VH | IGHV3-30 o IGHV3-33 | IGHJ6 | IGHD3-3 |
| VL | IGLV6-57 | IGLJ3 | |

SEQ ID NO: 25: VL de Tfr421

DFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPD
 RFGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHWWVFGGGTKLAVL

SEQ ID NO: 26: VL de TfR422

DFMLTQPQSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPD
RFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNQWVFGGGTKLAVL

5 SEQ ID NO: 46: VL de TfR006

SEQ ID NO: 47: IGLV6-57

10 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPD
RFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSN

15 Puesto que el subgrupo 6 de IMGT sólo tiene un gen de la línea germinal, resulta imposible obtener una secuencia de consenso. Por tanto, se obtuvo una secuencia de consenso usando el subgrupo 6 junto con los subgrupos 1 y 2 (SEQ ID NO: 27). Basándose en esta secuencia de consenso, se prepararon cuerpos modificados del anticuerpo TfR006, VL de TfR423 (SEQ ID NO: 28) y VL de TfR424 (SEQ ID NO: 29).

SEQ ID NO: 27: secuencia de consenso 1, 2 y 6 de VL

20 Q_SxLTQPPSVSGSPGQSVTISCTGSSSNIGS_xN_yVSWYQ_xPGtAPKLMYENNKRPSGVPDR
FSGSK_{xx}SGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSWD_sSl_Sx

SEQ ID NO: 28: VL de TfR423

25 DSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGSSSNILASNSVQWYQQLPGtAPKTVIYEDTQRPSGVPDR
FSGSKDSSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYDSAYHWVFGGGTKLAVL

SEQ ID NO: 29: VL de TfR424

30 DSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGSSSNILASNSVQWYQQLPGtAPKTVIYENTQRPSGVPDR
FSGSKDSSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYDSAYHWVFGGGTKLAVL

35 Una VL de anticuerpo humano que es la más próxima a VL de TfR006 es SUT (n.º de registro: P06317, SEQ ID NO: 30). Las dos VL anteriores son diferentes en un total de 15 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos. Basándose en esta información, se obtuvieron las secuencias de VL de TfR425 (SEQ ID NO: 31) y VL de TfR426 (SEQ ID NO: 32) según un método de modificación similar a la tecnología de humanización.

35 SEQ ID NO: 30: SUT

DFMLTQPHSVSESPGKTVIISCTRSDGTIAGYYVQWYQQRPGRAPTTVIFEDTQRPSGVPD
RFSGSIDRSSNSASLTISGLQTEDEADYYCQSYDRDHWVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO: 31: VL de TfR425

40 DFMLTQPHSVSESPGKTVIISCTRSDGTIAGYYVQWYQQRPGRAPTTVIFEDTQRPSGVPD
RFSGSIDRSSNSASLTISGLQTEDEADYYCQSYDSRDHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 32: VL de TfR426

45 DFMLTQPQSVSESPGKTVIISCTRSTGTIASNSVQWYQQRPGRAPTTVIFDETQRPSGVPDR
FSGSIDRSSNSASLTISGLQTEDEADYYCQSYDSRDQWVFGGGTKLTVL

(2) Modificación de la cadena L del anticuerpo TfR006

50 Se injertó la CDR de la cadena lambda de un anticuerpo TfR006 en la secuencia de consenso (SEQ ID NO: 33) del subgrupo I de la cadena kappa para obtener la secuencia de aminoácidos de VL de un anticuerpo TfR427 (SEQ ID

NO: 34). Además, se buscó un gen de la línea germinal que es el más próximo a esta secuencia de aminoácidos, cuando se convierte en una secuencia de nucleótidos, en la base de datos de IMTG. Como resultado, se encontró que era IGKV1-5. Se injertó la CDR de la cadena lambda de TfR006 en el marco de esta IGKV1-5 (n.º de registro: Z00001, SEQ ID NO: 35) para obtener la VL (SEQ ID NO: 36) de un anticuerpo TfR428. Además, se llevaron a cabo sustituciones D92N y H95Q en la CDR3 de VL del anticuerpo TfR428 para obtener las secuencias de VL de un anticuerpo TfR429 (SEQ ID NO: 37) y un anticuerpo TfR430 (SEQ ID NO: 38).

SEQ ID NO: 33: secuencia de consenso KVI humana

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRF
 SSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYNLSPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 34: VL de TfR427

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIASNSVQWYQQKPGKAPKTVIYEDTQLESGVPSR
 FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQSYDSAYHWVFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 35: IGKV1-5

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSR
 FSGSGSGTEFTLTITSSLPDDFATYYCQQYNSSYS

SEQ ID NO: 36: VL de TfR428

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIASNSVQWYQQKPGKAPKTVIYEDTQLESGVPSR
 FSGSGSGTEFTLTITSSLPDDFATYYCQSYDSAYHWVFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 37: VL de TfR429

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIASNSVQWYQQKPGKAPKTVIYEDTQLESGVPSR
 FSGSGSGTEFTLTITSSLPDDFATYYCQSYNSAYHWVFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 38: VL de TfR430

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIASNSVQWYQQKPGKAPKTVIYEDTQLESGVPSR
 FSGSGSGTEFTLTITSSLPDDFATYYCQSYNSAYQWVFGQGTKVEIK

Una cadena κ humana que es próxima a la secuencia de aminoácidos de VL de un anticuerpo TfR417 es WEA (n.º de registro: P01610, SEQ ID NO: 39). Se injertó la CDR de la cadena lambda de TfR006 en este marco. Por tanto, se obtuvo la secuencia de VL de un anticuerpo TfR431 (SEQ ID NO: 40). Además, se llevaron a cabo sustituciones D92N y H95A en la CDR3 de un anticuerpo TfR431 para obtener las secuencias de VL de los anticuerpos TfR432 y TfR433.

SEQ ID NO: 39: WEA

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGI RNDLTWYQQKPGTAPKRLIYGATSLQSGVPSR
 FSGSGSGTEFTLTINSLQPEDFATYYCLQYSSFPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 40: VL de TfR431

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIASNSVQWYQQKPGTAPKTVIYEDTQLQSGVPSR
 FSGSGSGTEFTLTINSLQPEDFATYYCQSYDSAYHWVFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 41: VL de TfR432

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIASNSVQWYQQKPGTAPKTVIYEDTQLQSGVPSR
 FSGSGSGTEFTLTINSLQPEDFATYYCQSYNSAYHWVFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 42: VL de TfR433

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIASNSVQWYQQKPGTAPKTVIYEDTQLQSGVPSR
 5 FSGSGSGTEFTLTINSLQPEDFATYYCQSYNSAYQWVFGQGTKVEIK

Ejemplo 5: Producción de cada anticuerpo modificado

(1) Producción de plásmido que expresa cada anticuerpo TfR006 modificado

10 Se conectaron cada una de las VH y VL modificadas de TfR006 obtenidas anteriormente con una región constante G1 humana (SEQ ID NO: 48) o con la correspondiente región constante de cadena L (λ : SEQ ID NO: 49 y κ : SEQ ID NO: 50). GenScript sintetizó completamente los genes de cadena H y cadena L, a los que se añadió NheI al extremo 5' de los mismos y se añadió EcoRI al extremo 3' de los mismos. Se incorporaron cada uno de los genes de cadena pesada y cadena ligera así sintetizados en diferentes vectores de expresión. Es decir, se escindieron cada uno de los genes sintetizados artificialmente de la cadena H y la cadena L con NheI y EcoRI y entonces se incorporaron las escisiones en los sitios NheI y EcoRI del vector de expresión pCAGGS para obtener un vector de expresión de cadena H de anticuerpo mutante y un vector de expresión de cadena L de anticuerpo mutante.

(2) Expresión transitoria de anticuerpo TfR006 modificado

25 Se usó FreeStyle (Life Technologies) para la expresión transitoria de un anticuerpo TfR006 modificado. Se subcultivaron 293-F (Life Technologies) usadas como células flotantes para la transfección génica el día anterior a la transfección. El día de la transfección se prepararon 400 ml de una suspensión celular cuya densidad celular se había ajustado a 1×10^6 células/ml por anticuerpo. Se preparó la disolución I suspendiendo un total de 200 μ g de plásmido (100 μ g de un vector de expresión de cadena pesada de TfR006 de cada anticuerpo y 100 μ g de un vector de expresión de cadena ligera de TfR006 de cada anticuerpo) en OptiPro SFM. Posteriormente, se añadieron 200 μ l de reactivo MAX a 8 ml de OptiPRO (disolución II). Se mezcló la disolución (I) con la disolución (II) y entonces se dejó en reposo la disolución así mezclada a temperatura ambiente durante de 10 a 20 minutos. Se añadió un total de 16 ml de la disolución de reacción a 400 ml de un medio de expresión 293, en el que se habían suspendido células 293-F, y entonces se cultivó la mezcla obtenida a 37°C en el 8% de CO₂ durante de 6 a 7 días usando un agitador de cultivo celular TAITEC BioShaker BR-43FL. Después de 6 a 7 días de cultivo, se recuperó un sobrenadante del cultivo que contenía un anticuerpo recombinante TfR006 y esto se usó como material para la purificación.

(3) Purificación del anticuerpo IgG TfR006

40 Se purificó cada proteína de anticuerpo contenida en un sobrenadante del cultivo de la línea celular que expresa de manera transitoria el anticuerpo usando una columna de afinidad Ab-Capcher ExTra (ProteNova) usando AKTAprime. Se sometió la fracción máxima obtenida a filtración en gel usando una columna Sephacryl S-300 que se había equilibrado con PBS de Dulbecco como disolvente, para purificarla adicionalmente. Se cuantificó la proteína de anticuerpo purificada usando un coeficiente de absorción.

(4) Cuantificación de anticuerpo mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)

45 Se cuantificaron la concentración de un anticuerpo contenido en un sobrenadante del cultivo de células productoras de anticuerpo IgG TfR006 y la concentración de un anticuerpo purificado basándose en la absorbancia, y también se cuantificó mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Como anticuerpo de fase sólida se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H + L) (que se había absorbido previamente frente a IgG de ratón, de conejo, bovina y de ratón) (COMSO BIO: American Qualex International, Inc.; AQL, n.º de cat. A-110UD) en una cantidad de 100 μ l/pocillo (concentración: 5 μ g/ml) a una placa y entonces se dejó en reposo a 4°C durante un día y una noche. Posteriormente, se añadió Block Ace en una cantidad de 200 μ l/pocillo a la placa para bloquear el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eso, se sometió el anticuerpo como muestra a dilución en serie y después se añadió a cada pocillo, seguido por incubación durante 1 hora para realizar una reacción. Se lavó el producto de reacción con PBST (Tween 20 al 0,05% y PBS) cinco veces y, después, se añadió una disolución de anticuerpo de detección preparada mediante dilución 1/10 000 de anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H + L) (absorbido frente a IgG de ratón, de conejo, bovina y de ratón) - HRP (COSMO BIO: AQL, n.º de cat. A-110PD) con PBST en una cantidad de 100 μ l/pocillo a la mezcla resultante. Se incubó la mezcla obtenida durante 1 hora y después se lavó con PBST cinco veces. Después de eso, se añadió un tampón de sustrato TMB en una cantidad de 100 μ l/pocillo a la mezcla resultante. Se incubó la mezcla obtenida a temperatura ambiente en un lugar oscuro durante 15 minutos y se añadió entonces una disolución de terminación de reacción a la misma en una cantidad de 100 μ l/pocillo para terminar la reacción. Después de eso, se midió la absorbancia a 450 nm. Usando IgG humana

purificada como producto patrón, se obtuvo una curva de calibración y se calculó la concentración de un anticuerpo humano usando esta curva de calibración.

Ejemplo 6: Reactividad de anticuerpo TfR006 modificado

Se usaron células K562 que expresaban TfR (ATCC CCL-243: CML) para examinar la reactividad de cada anticuerpo modificado con un antígeno. Se recuperaron células K562 mediante centrifugación y después se lavaron con PBS una vez. Después de eso, se suspendieron las células resultantes en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1%, EDTA 2 mM y NaN₃ al 0,1%), dando como resultado una densidad celular de 1 x 10⁶ células/ml. Se dispensaron 100 µl de esta suspensión celular en una placa de fondo en V de 96 pocillos (Costar 3897). Después de eso, se ajustó cada anticuerpo a de 0,2 a 2 µg/ml con tampón FACS y se añadieron entonces 100 µl de cada disolución de anticuerpo a las células. Se incubó la mezcla obtenida a 4°C durante 1 hora. Después de eso, se lavaron las células resultantes con tampón FACS dos veces y se añadieron entonces 100 µl de disolución de anticuerpo anti-IgG humana-Alexa488 (Invitrogen) que se había diluido 750 veces con tampón FACS a las células. Se agitó la mezcla así obtenida y después se incubó a 4°C durante 1 hora. Se lavó la mezcla resultante mediante centrifugación con tampón FACS dos veces y se colocó entonces en HTS de FACS Calibur (BD) para medir la intensidad de fluorescencia de FL1 en cada pocillo. Tal como se muestra en la figura 1, cada uno de los anticuerpos modificados (a: 1 ng/ml; b: 10 ng/ml; c: 100 ng/ml; y d: 1 µg/ml) presentó reactividad con K562, que fue equivalente a la reactividad del anticuerpo original TfR006.

Ejemplo 7: Efecto de inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vitro* de anticuerpos TfR modificados

Se ajustó la línea celular K-562 que expresa TfR (ATCC CCL-243) o la línea celular de ATL MT-2 a una densidad celular de 2500 células/ml con un medio de cultivo y entonces se dispuso cada disolución celular en una cantidad de 100 µl/pocillo en una placa de fondo plano de 96 pocillos (NUNC 167008). Después de eso, se preparó una serie de dilución de cada anticuerpo TfR006 modificado (de 4,6 ng a 10 µg/ml) y se añadieron 100 µl del anticuerpo preparado a las células. Se cultivaron las células a 37°C en el 5% de CO₂ en 95% de aire durante 96 horas. Tras la finalización del cultivo, se añadieron 200 µl de kit de recuento celular (DOJINDO) a la placa y entonces se cultivó la mezcla obtenida a 37°C en el 5% de CO₂ al 5% en 95% de aire durante 3 horas. Se midió la absorbancia a 450 nm. Se calculó la tasa de crecimiento celular tras la adición del anticuerpo en cada concentración a partir de la fórmula de cálculo a continuación. Usando el software Master Plex 2010 (Hitachi Solutions, Ltd.), se obtuvo una concentración de anticuerpo que presentaba una tasa de crecimiento del 50% (CI50) (tabla 7). Tal como se muestra en la figura 2, el anticuerpo TfR006 modificado inhibió el crecimiento de células cancerosas en casi el mismo nivel que el anticuerpo original.

Tasa de crecimiento = valor del pocillo al que se le ha añadido anticuerpo – blanco (sólo medios de cultivo) / valor de control (pocillo al que no se le ha añadido anticuerpo) – blanco (sólo medios de cultivo) x 100%

[Tabla 7]

Tabla 7: Concentración de anticuerpo que presenta una tasa de crecimiento del 50% (CI50)

| Anticuerpo | CI50 de TfR (ng/ml) | |
|------------|---------------------|------|
| | K562 | MT-2 |
| TfR006 | 34 | 8 |
| TfR402 | 41 | 9 |
| TfR404 | 175 | 19 |
| TfR406 | 206 | 21 |
| TfR434 | 39 | 8 |
| TfR435 | 38 | 10 |
| TfR436 | 39 | 11 |

Ejemplo 8: Efectos antitumorales de anticuerpos TfR modificados en modelos de xenoinjerto de la línea celular de ATL

Se cultivó la línea celular de ATL SU9T1 en un medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA) complementado con FBS al 10%. Para el trasplante, se recuperaron las células mediante centrifugación y después se suspendieron en RPMI 1640 hasta una densidad celular de 1 x 10⁸ células/ml. Se mezcló esta suspensión celular con la misma cantidad de Matrigel (Becton, Dickinson and Company) y entonces se trasplantó la mezcla obtenida en la hipodermis del abdomen derecho de cada ratón SCID (hembra de 6 semanas de edad, KYUDO CO., LTD.). Tras la finalización del trasplante, se midió el diámetro tumoral de cada ratón con un pie de rey dos veces a la semana. En el momento en el que el volumen tumoral medio alcanzó aproximadamente 150 mm³, los ratones se dividieron en algunos grupos (cinco ratones por grupo) según una asignación aleatoria respecto al volumen tumoral. A los grupos se les administró cada uno de los anticuerpos TfR006, TfR402, TfR403, TfR404 y TfR406 en la vena caudal de cada ratón en una cantidad de 5 mg/kg de grupo y se administró cada uno de los anticuerpos TfR435 y TfR436 en la vena

caudal de cada ratón en cantidades de 10 mg/kg de grupo y 3 mg/kg de grupo. A un grupo de control negativo se le administró PBS en una cantidad de 0,2 ml/20 g de ratón en la vena caudal de cada ratón. Se llevó a cabo la administración dos veces a la semana (cada tres o cuatro días) en un total de cinco veces. Tras la finalización de la administración, se midió el diámetro tumoral con un pie de rey dos veces a la semana y se obtuvo el volumen tumoral en cada grupo, como en el caso antes de la asignación. Se determinaron los efectos tumorales basándose en los volúmenes tumorales el día final de la medición según una prueba de comparación múltiple paramétrica de Dunnett, usando el grupo de PBS como control.

Se calculó el volumen tumoral según la siguiente fórmula.

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{Eje menor})^2 \times \text{Eje mayor} \times 0,5$$

Se realizaron la asignación aleatoria y la prueba de comparación múltiple usando software de análisis estadístico de datos de experimentos en animales EXSUS (CLC Corporation).

Se muestra un cambio a lo largo del tiempo en un valor medio de los volúmenes tumorales en cada grupo en las figuras 4 y 5. Tal como se muestra en las figuras 4 y 5, se inhibió el crecimiento de un tumor mediante cada anticuerpo TfR administrado. En particular, tal como se muestra en la figura 4, el anticuerpo modificado TfR402 presentó un efecto de inhibición del crecimiento tumoral más fuerte que el anticuerpo original TfR006. Los anticuerpos TfR435 y TfR436 no sólo inhibieron el crecimiento de un tumor, sino que también presentaron un efecto de reducción de tumor significativo, en una cantidad de 10 mg/kg (figura 5).

Ejemplo 9: Efectos antitumorales de anticuerpos TfR modificados sobre modelos de xenoinjerto de leucemia

Se cultivó la línea de células de leucemia K562 (ATCC CCL-243) en un medio de cultivo RPMI 1640 complementado con FBS al 10%. Para el trasplante, se recuperaron las células mediante centrifugación y después se suspendieron en RPMI 1640 hasta una densidad celular de 5×10^7 células/ml. Se trasplantó la suspensión de células cancerosas obtenida en una cantidad de 100 μ l/ratón en la hipodermis del abdomen derecho de cada ratón SCID (hembra de 7 semanas de edad, CLEA Japan, Inc.), dando como resultado una cantidad de 5×10^6 células/ratón. Tras la finalización del trasplante, se midió el diámetro de un tumor con un pie de rey y entonces se obtuvo el volumen del tumor a partir de la fórmula a continuación. En el momento en el que el volumen tumoral medio alcanzó 150 mm³ o más, los ratones se dividieron en algunos grupos (n = 5), usando software de agrupamiento (EXSAS versión 7.6, CLC Corporation). Con respecto a cada uno de los grupos de administración de anticuerpo, se administraron el anticuerpo TfR006, anticuerpo TfR402, anticuerpo TfR404, anticuerpo TfR406, anticuerpo TfR435 y anticuerpo TfR436 en una cantidad de 5 mg/kg de ratón en la vena caudal de cada ratón. Además, con respecto a grupos de administración de dosis baja, se administraron el anticuerpo TfR402, anticuerpo TfR434, anticuerpo TfR435 y anticuerpo TfR436 en una cantidad de 1 mg/kg de ratón en la vena caudal de cada ratón. A un grupo de control negativo se le administró PBS en una cantidad de 0,2 ml/20 g ratón en la vena caudal de cada ratón. Se llevó a cabo la administración dos veces a la semana (cada tres o cuatro días) en un total de cinco veces. Tras la finalización de la administración, se midió el diámetro tumoral con un pie de rey dos veces a la semana y se obtuvo el volumen tumoral en cada grupo. Se determinaron los efectos antitumorales basándose en los volúmenes tumorales.

Se calculó el volumen tumoral según la siguiente fórmula.

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{Eje menor})^2 \times \text{Eje mayor} \times 0,5$$

Se muestra un cambio a lo largo del tiempo en un valor medio de los volúmenes tumorales en cada uno de los grupos de administración de anticuerpo de 5 mg/kg en las figuras 6 y 7. Tal como se muestra en las figuras 6 y 7, se inhibió el crecimiento de un tumor mediante cada anticuerpo TfR administrado. En particular, tal como se muestra en la figura 6, los anticuerpos modificados TfR402, TfR404 y TfR406 presentaron todos un efecto de inhibición del crecimiento tumoral más fuerte que el anticuerpo original TfR006. Es particularmente notable que los anticuerpos TfR435 y TfR436 inhibieron significativamente el crecimiento de un tumor, incluso a una baja cantidad de 1 mg/kg (figura 8).

Ejemplo 10: Efectos antitumorales de anticuerpos TfR modificados sobre modelos de xenoinjerto de cáncer sólido

Se cultivó la línea celular de cáncer de vejiga BFTC-905 (DSMZ; ACC361) en un medio de cultivo DMEM (SIGMA) complementado con FBS al 10%. Para el trasplante, se recuperaron las células mediante centrifugación y después se suspendieron en RPMI 1640 hasta una densidad celular de 5×10^7 células/ml. Se trasplantó la suspensión de células cancerosas obtenida en una cantidad de 100 μ l/ratón en la hipodermis del abdomen derecho de cada ratón SCID (hembra de 7 semanas de edad, CLEA Japan, Inc.), dando como resultado una cantidad de 5×10^6 células/ratón. Tras la finalización del trasplante, se midió el diámetro de un tumor con un pie de rey y entonces se obtuvo el volumen del tumor a partir de la fórmula a continuación. En el momento en el que el volumen tumoral medio alcanzó 200 mm³ o más, los ratones se dividieron en algunos grupos (n = 5), usando software de agrupamiento (EXSAS versión 7.6, CLC Corporation). Con respecto a cada uno de los grupos de administración de anticuerpo, el anticuerpo TfR435 y el anticuerpo TfR436 se administraron en una cantidad de 10 mg/kg de ratón en

la vena caudal de cada ratón. A un grupo de control negativo se le administró PBS en una cantidad de 0,2 ml/20 g de ratón en la vena caudal de cada ratón. Se llevó a cabo la administración dos veces a la semana (cada tres o cuatro días) en un total de cinco veces. Tras la finalización de la administración, se midió el diámetro tumoral con un pie de rey dos veces a la semana y se obtuvo el volumen tumoral en cada grupo. Se determinaron los efectos tumorales basándose en los volúmenes tumorales.

Se calculó el volumen tumoral según la siguiente fórmula.

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{Eje menor})^2 \times \text{Eje mayor} \times 0,5$$

Se muestra un cambio a lo largo del tiempo en un valor medio de los volúmenes tumorales en cada uno de los grupos de administración de anticuerpo en la figura 9. Tal como se muestra en la figura 9, se inhibió el crecimiento de un tumor mediante administración de los anticuerpos TfR435 y TfR436.

Ejemplo 11: Construcción de plásmidos que expresan anticuerpos IgG de los anticuerpos 3TF12 y 3GH7 (documento WO 2011/073943)

El documento WO 2011/073943 describe un monómero scFv y un anticuerpo dimérico contra TfR humano. Con el fin de comparar el anticuerpo de la presente invención con el anticuerpo descrito en el documento WO 2011/073943, se prepararon anticuerpos IgG1 de los anticuerpos 3TF12 y 3GH7 scFv descritos en el documento WO 2011/073943. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de 3TF12 scFv se muestran en SEQ ID NO: 55 y 56, respectivamente. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de 3GH7 scFv se muestran en SEQ ID NO: 57 y 58, respectivamente.

Para la producción de los anticuerpos IgG1, como en el caso de la producción del anticuerpo de la presente invención, se adoptó un método para producir anticuerpos que comprende incorporar cada uno de un gen de cadena pesada y un gen de cadena ligera en un vector de expresión diferente y después cotransfectar dos tipos de plásmidos, concretamente, un vector de expresión de cadena pesada y un vector de expresión de cadena ligera tras la introducción génica.

Respecto a una cadena pesada, se insertó la secuencia de nucleótidos de una región variable en un vector de casete, en el que ya se había incorporado un gen G1 humano. Las regiones variables fueron la región variable de cadena pesada de 3TF12 scFv (número de secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 59; y número de secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 60) y la región variable de cadena pesada de 3GH7 scFv (número de secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 61; y número de secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 62).

Respecto a una cadena ligera, todo un gen de cadena ligera formado conectando una región constante con una región variable se incorporó en un vector de expresión. Las regiones variables de la cadena ligera fueron la región variable de cadena ligera de 3TF12 scFv (número de secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 63; y número de secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 64) y la región variable de cadena ligera de 3GH7 scFv (número de secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 65; y número de secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 66).

Se conectó IGLC3*01 (n.º de registro de GenBank: J00254), que es una región constante lambda, con la secuencia de nucleótidos de cada región variable. Se añadieron a la secuencia (número de secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 67; y número de secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 68) los dos aminoácidos N-terminales GQ (correspondientes a GGTCAG en la secuencia de nucleótidos), que se había confirmado que se delecionaron en el n.º de registro J00254 en la base de datos.

Cada gen se sometió a la optimización de la secuencia de nucleótidos del mismo, sin cambiar la secuencia de aminoácidos original, y se sintetizó por GenScript. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del 3TF12 sintetizado en SEQ ID NO: 69, se muestra la secuencia de nucleótidos optimizada del mismo en SEQ ID NO: 70, se muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mismo en SEQ ID NO: 71 y se muestra la secuencia de nucleótidos optimizada del mismo en SEQ ID NO: 72. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del 3GH7 sintetizado en SEQ ID NO: 73, se muestra la secuencia de nucleótidos optimizada del mismo en SEQ ID NO: 74, se muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mismo en SEQ ID NO: 75 y se muestra la secuencia de nucleótidos optimizada del mismo en SEQ ID NO: 76. Se ha divulgado la secuencia de aminoácidos del gen IGHG1 humano usado en Uniprot (P01857) y se muestra la secuencia de aminoácidos del mismo en SEQ ID NO: 77 y se muestra la secuencia de nucleótidos del mismo en SEQ ID NO: 78. Para la síntesis total de un gen se añadió el sitio de reconocimiento NheI de enzimas de restricción al lado 5 prima del gen sintetizado y se añadió el sitio de reconocimiento NheI de enzimas de restricción al lado 3 prima del mismo, para la comodidad de construcción. Al tratar el gen sintetizado con estas enzimas de restricción, se llevó a cabo la recombinación del gen de anticuerpo a partir de un vector de subclonación a un vector de expresión.

Ejemplo 12: Expresión transitoria de anticuerpos IgG de los anticuerpos 3TF12 y 3GH7 (documento WO 2011/073943)

El día anterior a la transfección se añadieron células Expi293F (Life Technologies) a una densidad celular de $1,4 \times 10^6$ células/ml a 85 ml de medio PowerCHO-2CD (LONZA) en un matraz de Erlenmeyer y se sometió entonces la mezcla obtenida a cultivo agitado en condiciones de 37°C y el 8% de CO₂, mientras se ajustaba el número de rotaciones por minuto (rpm) a 135.

Se llevó a cabo la introducción de un gen de anticuerpo en células Expi293F usando dos tipos de plásmidos, concretamente, un vector de expresión de cadena pesada y un vector de expresión de cadena ligera.

Para la transfección en células Expi293F se añadieron 50 µg de un vector de expresión de cadena pesada y 50 µg de un vector de expresión de cadena ligera a 5 ml de Opti-MEM (Life Technologies) en el tubo 1 y se combinó completamente la mezcla obtenida. Posteriormente, se añadieron 5 ml de Opti-MEM y 0,27 ml de reactivo ExpiFectamine293 al tubo 2 y se combinó completamente la mezcla obtenida. Se añadió la disolución mezclada en el tubo 2 a la disolución mezclada en el tubo 1 y se agitó la disolución mezclada así obtenida y entonces se dejó en reposo a temperatura ambiente durante de 20 a 30 minutos. Después de eso, se añadió la mezcla a células Expi293F que se habían sometido a cultivo agitado el día anterior (transfección). De dieciséis a dieciocho horas después de la transfección, se añadieron 0,5 ml de potenciador de la transfección ExpiFectamine293 1 y 5 ml de potenciador de la transfección ExpiFectamine293 2 a la disolución de reacción. Después de eso, se cultivó la mezcla obtenida a 37°C en el 8% de CO₂ a una velocidad de rotación de 135 rpm durante 6 días. Siete días después de la transfección, se recuperó un sobrenadante del cultivo. Se retiraron las células mediante centrifugación y se hizo pasar entonces el residuo a través de un filtro de 0,2 µm. Se usó el residuo resultante para la purificación de anticuerpos.

Ejemplo 13: Purificación de anticuerpos IgG de anticuerpos 3TF12 y 3GH7 (documento WO 2011/073943)

Se llevó a cabo la purificación de anticuerpos usando en primer lugar un portador de intercambio aniónico y usando después un portador de proteína A. Se purificó un sobrenadante de cultivo de células Expi293F de expresión transitoria usando AKTAPrime plus. Se aplicó el sobrenadante resultante a una columna CaptoQ (GE Healthcare) (volumen de columna: 10 ml) a una velocidad de flujo de 5 ml/min. La fracción obtenida que contiene anticuerpos es una fracción de flujo continuo. Sin embargo, puesto que el ácido nucleico (genoma y ARN), así como la proteína, se unen al portador de intercambio aniónico, de modo que pueden eliminarse, se hace posible usar de manera útil la capacidad de unión de la proteína A. Se aplicó la fracción obtenida a un portador de proteína A (Ab-Capcher ExTra: ProteNova; 10 ml) a una velocidad de flujo de 5 ml/min y, después de eso, se usó D-PBS como tampón de lavado a la misma velocidad de flujo que la de la aplicación de la fracción. Se estableció el volumen de una fracción de elución en 4 ml/tubo de ensayo y entonces se llevó a cabo fraccionamiento. Se llevó a cabo elución usando un tampón de glicina-HCl 0,1 M (pH 2,7) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. Se habían añadido previamente 120 µl de un tampón Tris-HCl 1 M (pH 8,5) a un tubo de ensayo para fraccionar la disolución eluida y, al mismo tiempo que la elución, se devolvió inmediatamente el pH desde un intervalo ácido hasta un intervalo neutro de aproximadamente pH 6,5. Se detectó la cantidad de una proteína a una absorbancia de 280 nm y se fraccionó una fracción máxima. Se sometió esta fracción máxima a una celda de agitación Millipore, en la que se usó un disco de ultrafiltración Ultracell con un peso molecular de punto de corte de 30 000, y se concentró la disolución eluida, mientras que el tampón se intercambió con D-PBS.

Ejemplo 14: Comparación de afinidad con anticuerpos IgG 3TF12 y 3GH7

Se suspendió el antígeno de TfR soluble preparado en el ejemplo 2 en una cantidad de 2 µg/ml en PBS (KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 136,89 mM y Na₂HPO₄ 8,04 mM) y entonces se dispensó la suspensión obtenida en una placa de 96 pocillos (Nunc Immunomodule MaxiSorp (Thermo Scientific, cat. 468667)) en una cantidad de 100 µl/pocillo. Entonces se dejó en reposo a 4°C durante la noche.

El día siguiente, se descartó la disolución en el pocillo. Se dispensó una disolución madre de Block Ace (DS Pharma Biomedical, n.º cat. UK-B40) en la placa en una cantidad de 200 µl/pocillo y entonces se agitó a temperatura ambiente usando un agitador de placas (IKA, n.º cat. MTS 2/4 digital) durante 1 hora para llevar a cabo bloqueo. Después de eso, se descartó la disolución y entonces se lavó la placa (usando un lavador de placas (Biotech, n.º cat. MW-96AR) con 250 µl de tampón A (PBS + Tween 20 al 0,05%) x 5 veces). Posteriormente, se diluyeron los anticuerpos purificados TfR436, 3TF12 y 3GH7 con tampón A para que tuvieran concentraciones diferentes. Cada una de las disoluciones así preparadas se dispensaron en la placa en una cantidad de 100 µl/pocillo. Entonces se agitó a temperatura ambiente usando un agitador de placas durante 1 hora.

Se descartó la disolución y entonces se lavó la placa. Después de eso, se diluyó un anticuerpo anti-IgG humana marcado con HRP (anticuerpo de cabra anti-IgG humana frente a fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado con peroxidasa, específico del fragmento Fc_γ (Jackson ImmunoResearch, n.º cat. 109-036-098)) 50 000 veces con tampón A. Se dispensó la disolución así preparada en la placa en una cantidad de 100 µl/pocillo. Se agitó entonces a temperatura ambiente usando un agitador de placas durante 1 hora.

Después de que la placa se hubiera lavado, se añadió disolución de coloración TMB (SCYTEC, n.º cat. TM4999) a la placa en una cantidad de 100 µl/pocillo. Entonces se dejó en reposo en un lugar oscuro durante 8 minutos para el desarrollo de color. Se añadió una disolución de detención (SCYTEC, cat. TSB999) a la placa en una cantidad de 100 µl/pocillo y entonces se midió la absorbancia a 450 nm (A450) usando un lector de placas (CORONA ELECTRIC Co., Ltd., n.º cat. MTP450).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10. Tal como se muestra en la figura 10, el anticuerpo TfR436 presentó una reactividad significativamente mayor que 3TF12 y 3GH7. Estos resultados sugirieron que el anticuerpo TfR436 tenía una afinidad por el antígeno TFR que fue más fuerte que las de los anticuerpos 3TF12 y 3GH7.

Ejemplo 15: Comparación con anticuerpos IgG 3TF12 y 3GH7 en cuanto a efectos medicinales *in vivo*

Se cultivó la línea de células de leucemia K562 (ATCC CCL-243) en un medio de cultivo RPMI 1640 complementado con FBS al 10%. Para el trasplante, se recuperaron las células mediante centrifugación y después se suspendieron en RPMI 1640 hasta una densidad celular de 5×10^7 células/ml. Se trasplantó la suspensión de células cancerosas obtenida en una cantidad de 100 µl/ratón en la hipodermis del abdomen derecho de cada ratón SCID (hembra de 7 semanas de edad, CLEA Japan, Inc.), dando como resultado una cantidad de 5×10^6 células/ratón. Tras la finalización del trasplante, se midió el diámetro de un tumor con un pie de rey y entonces se obtuvo el volumen del tumor a partir de la fórmula a continuación. En el momento en el que el volumen tumoral medio alcanzó 150 mm³ o más, los ratones se dividieron en algunos grupos (n = 5), usando software de agrupamiento (EXSAS versión 7.6, CLC Corporation). Con respecto a cada uno de los grupos de administración de anticuerpo, se administraron el anticuerpo TfR435, anticuerpo TfR436, anticuerpo 3TF12 y anticuerpo 3GH7T en una cantidad de 1 mg/kg en la vena caudal de cada ratón. A un grupo de control negativo se le administró PBS en una cantidad de 0,2 ml/20 g de ratón en la vena caudal de cada ratón. Se llevó a cabo la administración dos veces a la semana (cada tres o cuatro días) en un total de cinco veces. Tras la finalización de la administración, se midió el diámetro tumoral con un pie de rey dos veces a la semana y se obtuvo el volumen tumoral en cada grupo. Se determinaron los efectos tumorales basándose en los volúmenes tumorales.

Se calculó el volumen tumoral según la siguiente fórmula.

Volumen tumoral = (Eje menor)² x Eje mayor x 0,5

Se muestra un cambio a lo largo del tiempo en un valor medio de los volúmenes tumorales en cada uno de los grupos de administración de anticuerpo en la figura 11. Tal como se muestra en la figura 11, el crecimiento de un tumor se inhibió significativamente mediante la administración de cada uno de los anticuerpos TfR435 y TfR436 en una cantidad de 1 mg/kg. Por otro lado, los anticuerpos 3TF12 y 3GH7 no inhibieron significativamente el crecimiento de un tumor.

Lista de secuencias

<110> Perseus Proteomics Inc. Universidad de Miyazaki

<120> Un anticuerpo que puede reconocer específicamente un receptor de transferrina

<130> 131944A

<160> 78

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> humano

<400> 1

Ser Tyr Gly Met His

5

<210> 2

ES 2 689 782 T3

<211> 17
<212> PRT
5 <213> humano
<400> 2
Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
10 <210> 3
<211> 14
15 <212> PRT
<213> humano
<400> 3
20 Asp Ser Asn Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
1 5 10
<210> 4
25 <211> 13
<212> PRT
<213> humano
30 <400> 4
Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Ser Val Gln
1 5 10
35 <210> 5
<211> 8
<212> PRT
40 <213> humano
<400> 5
Tyr Glu Asp Thr Gln Arg Pro Ser
45 1 5
<210> 6
<211> 10
50 <212> PRT
<213> humano
55 <400> 6
Gln Ser Tyr Asp Ser Ala Tyr His Trp Val
1 5 10
<210> 7

ES 2 689 782 T3

<211> 14
 <212> PRT
 5 <213> humano
 <400> 7
 Asp Gly Asn Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
 10 1 5 10
 <210> 8
 <211> 14
 15 <212> PRT
 <213> humano
 20 <400> 8
 Asp Ser Ala Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
 1 5 10
 <210> 9
 25 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> humano
 <400> 9
 Asp Ser Asn Leu Trp Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
 35 1 5 10
 <210> 10
 <211> 14
 40 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 10
 45 Asp Ser Asn Phe Trp Gly Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
 1 5 10
 <210> 11
 50 <211> 14
 <212> PRT
 <213> humano
 55 <400> 11
 Asp Ser Ala Leu Trp Gly Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
 60 1 5 10
 <210> 12

ES 2 689 782 T3

<211> 14
<212> PRT
5 <213> humano
<400> 12
Asp Gly Asn Leu Trp Gly Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
1 5 10
10 <210> 13
<211> 14
15 <212> PRT
<213> humano
<400> 13
20 Asp Gly Ala Phe Trp Gly Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
1 5 10
<210> 14
25 <211> 14
<212> PRT
<213> humano
30 <400> 14
Asp Gly Ala Leu Trp Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
1 5 10
35 <210> 15
<211> 14
<212> PRT
40 <213> humano
<400> 15
Asp Gly Ala Leu Trp Gly Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
45 1 5 10
<210> 16
<211> 122
50 <212> PRT
<213> humano
55 <400> 16
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 689 782 T3

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

<210> 17

5 <211> 123

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 17

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

15 <210> 18

<211> 123

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 18

ES 2 689 782 T3

```

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

```

<210> 19

5 <211> 123

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 19

```

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

```

15

<210> 20

<211> 123

20 <212> PRT

<213> humano

<400> 20

25

ES 2 689 782 T3

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

<210> 21

5 <211> 123

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 21

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

15 <210> 22

<211> 123

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 22

25

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 689 782 T3

```

1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                20           25           30
Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35           40           45
Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Gly Ser Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
                65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85           90           95
Ala Arg Asp Gly Ala Leu Trp Gly Gly Tyr Tyr Ser Pro Val Asp Val
                100           105           110
Trp Gly Gln\201@Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115           120

```

<210> 23

5 <211> 123

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 23

```

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

```

15 <210> 24

<211> 123

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 24

ES 2 689 782 T3

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

<210> 25

5 <211> 111

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 25

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

15

<210> 26

<211> 111

20 <212> PRT

<213> humano

<400> 26

25

ES 2 689 782 T3

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

<210> 27

5 <211> 101

<212> PRT

<213> humano

10

<220>

<221> misc_feature

15

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

25

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> misc_feature

30

<222> (41)..(41)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (69)..(70)

40

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

45

<221> misc_feature

<222> (101)..(101)

50

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 27

ES 2 689 782 T3

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

<210> 28

5

<211> 112

<212> PRT

10 <213> humano

<400> 28

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

15

<210> 29

<211> 112

20 <212> PRT

<213> humano

<400> 29

25

ES 2 689 782 T3

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

<210> 30

5 <211> 111

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 30

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

15

<210> 31

<211> 111

20 <212> PRT

<213> humano

<400> 31

25

ES 2 689 782 T3

```

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

```

<210> 32

5 <211> 111

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 32

```

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

```

15 <210> 33

<211> 107

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 33

ES 2 689 782 T3

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

<210> 34

5 <211> 108

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 34

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

15 <210> 35

<211> 95

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 35

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

25

<210> 36

ES 2 689 782 T3

<211> 108

<212> PRT

5

<213> humano

<400> 36

```

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

10

<210> 37

<211> 108

15

<212> PRT

<213> humano

20

<400> 37

```

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

25

<210> 38

<211> 108

30

<212> PRT

<213> humano

<400> 38

ES 2 689 782 T3

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

<210> 39

5 <211> 107

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 39

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

15 <210> 40

<211> 108

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 40

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

25

ES 2 689 782 T3

100

105

<210> 41

5 <211> 108

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 41

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

15 <210> 42

<211> 108

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 42

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

25

<210> 43

<211> 123

30

<212> PRT

<213> humano

35 <400> 43

ES 2 689 782 T3

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

<210> 44

5 <211> 98

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 44

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

15 <210> 45

<211> 98

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 45

ES 2 689 782 T3

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

<210> 46

5 <211> 111

<212> PRT

<213> humano

10 <400> 46

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

15 <210> 47

<211> 98

<212> PRT

20 <213> humano

<400> 47

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

25

<210> 48

<211> 331

5 <212> PRT

<213> humano

<400> 48

10

```

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

<210> 49

15 <211> 106

<212> PRT

<213> humano

20

<400> 49

ES 2 689 782 T3

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

<210> 50

5

<211> 107

<212> PRT

10 <213> humano

<400> 50

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

15

<210> 51

<211> 760

20 <212> PRT

<213> humano

<400> 51

25

ES 2 689 782 T3

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

ES 2 689 782 T3

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

ES 2 689 782 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 705 | | | | 710 | | | | | 715 | | | | 720 | | |
| | Gln | Asn | Asn | Gly | Ala | Phe | Asn | Glu | Thr | Leu | Phe | Arg | Asn | Gln | Leu | Ala |
| | | | | | 725 | | | | | 730 | | | | 735 | | |
| | Leu | Ala | Thr | Trp | Thr | Ile | Gln | Gly | Ala | Ala | Asn | Ala | Leu | Ser | Gly | Asp |
| | | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | |
| | Val | Trp | Asp | Ile | Asp | Asn | Glu | Phe | | | | | | | | |
| | | | 755 | | | | | 760 | | | | | | | | |

<210> 52

5 <211> 17

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 52

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Val | Ile | Ser | Tyr | Asp | Gly | Ser | Ser | Lys | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Gly | | | | | | | | | | | | | | | |

15 <210> 53

<211> 17

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 53

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Val | Ile | Ser | Phe | Asp | Gly | Ser | Asn | Lys | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Gly | | | | | | | | | | | | | | | |

25

<210> 54

<211> 17

30

<212> PRT

<213> humano

35 <400> 54

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Val | Ile | Ser | Tyr | Asp | Gly | Ser | Asn | Lys | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Gly | | | | | | | | | | | | | | | |

40 <210> 55

<211> 245

<212> PRT

45 <213> humano

<400> 55

ES 2 689 782 T3

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

<210> 56

5

<211> 735

<212> ADN

10 <213> humano

<400> 56

caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ctccttcaac acctatacta tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcggat atagcatatg atgggagtag taaatactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgca 300
 gtggctgggt aagggactt cgatctctgg ggcctgggca ccctgggtcac cgtctcctca 360
 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcgggtggcg gatcgcagtc tgctctgact 420
 caggaccctg ctgtgtctgt ggccttggga cagacagtca ggatcacatg ccaaggagac 480
 agcctcagaa gctattatgc aagttggtac cagcagctcc caggaacggc ccccaactc 540
 ctcatctata ggaataatca gcggccctca ggggtccctg accgattctc tggctccaag 600
 tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccggc ccgaggatga ggctgattat 660
 tactgtgcag catgggatga cagcctgagt gcctgggtgt tcggcggagg gaccaagctg 720
 accgtcctag gtgcg 735

15

<210> 57

<211> 243

20 <212> PRT

ES 2 689 782 T3

<213> humano

<400> 57

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

<210> 58

<211> 729

10

<212> ADN

<213> humano

15 <400> 58

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| caggtgcagc | tgcaggagtc | ggggggaggc | gtggtccagc | ctgggaggtc | cctgagactc | 60 |
| tcctgtgcag | cctctcgatt | cacottcagt | agctatgcta | tgcactgggt | ccgccaggct | 120 |
| ccaggcaagg | ggctggagtg | ggtggcagtt | atatcatatg | atggaagcaa | taaatactac | 180 |
| gcagactccg | tgaagggccg | attcaccatc | tccagagaca | attccaagaa | cacgctgtat | 240 |
| ctgcaaatga | acagcctgag | agctgaggac | acggctgtgt | attactgtgc | gagagatctc | 300 |
| tcggggtacg | gtgactaccc | tgactactgg | ggccagggaa | ccctggtcac | cgtctcctca | 360 |
| ggtggaggcg | gttcaggcgg | aggtggctct | ggcgggtggcg | gatcgtctga | gctgactcag | 420 |
| gaccctgctg | tgtctgtggc | cttgggacag | acagtcagaa | tcacatgcca | aggagacagc | 480 |
| ctcagaagct | attatgcaag | ctggtaccag | cagaagccag | gacaggcccc | tgtacttgtc | 540 |
| atgtatggta | gaaacgagcg | gcctcaggg | gttcctgacc | gattctctgg | ctccaagtct | 600 |
| ggcacctctg | cctccctggc | catcagtggc | ctccagccag | aggatgaggc | taattattac | 660 |
| tgtgcagggt | gggatgacag | cctgactggt | ccggtgttcg | gcgaggggac | caagctgacc | 720 |
| gtcctaggt | | | | | | 729 |

<210> 59

20

<211> 120

ES 2 689 782 T3

<212> PRT

<213> humano

5

<400> 59

```

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

10 <210> 60

<211> 360

<212> ADN

15

<213> humano

<400> 60

```

caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt ctcttcaac acctatacta tgcactgggt cgcaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcgat atagcatatg atgggagtac taaatactac      180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgca      300
20  gtggctggtg aagggtactt cgatctctgg ggccgtggca ccctggtcac cgtctctca      360
    
```

<210> 61

<211> 120

25

<212> PRT

<213> humano

30 <400> 61

```

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

ES 2 689 782 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Ser Gly Tyr Gly Asp Tyr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 62

<211> 360

5

<212> ADN

<213> humano

10

<400> 62

caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctcgatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc 300
 tcgggggtacg gtgactaccc tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360

<210> 63

15

<211> 108

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 63

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

25

<210> 64

<211> 324

30

<212> ADN

<213> humano

<400> 64

35

ES 2 689 782 T3

```

cagtctgctc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc      60
acatgccaaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagtt ggtaccagca gctcccagga      120
acggcccccac aactcctcat ctataggaat aatcagcggc cctcaggggt ccctgaccga      180
ttctctggct ccaagtctgg cacctcagcc tccctggcca tcagtgggct ccggtccgag      240
gatgaggctg attattactg tgcagcatgg gatgacagcc tgagtgcctg ggtgttcggc      300
ggagggacca agctgaccgt ccta

```

<210> 65

5 <211> 106

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 65

```

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

```

15

<210> 66

<211> 318

20 <212> ADN

<213> humano

<400> 66

25

```

gagctgactc aggaccctgc tgtgtctgtg gccttgggac agacagtcag aatcacatgc      60
caaggagaca gcctcagaag ctattatgca agctggtacc agcagaagcc aggacaggcc      120
cctgtacttg tcatgtatgg tagaaacgag cggccctcag gggttcctga ccgattctct      180
ggctccaagt ctggcacctc tgccctccctg gccatcagtg gcctccagcc agaggatgag      240
gctaattatt actgtgcagg gtgggatgac agcctgactg gtccggtgtt cggcggaggg      300
accaagctga ccgtccta

```

<210> 67

30 <211> 106

<212> PRT

<213> humano

35

<400> 67

ES 2 689 782 T3

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

<210> 68

5 <211> 321

<212> ADN

<213> humano

10

<400> 68

ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttcccac cctcctctga ggagcttcaa 60
 gccacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtt 120
 gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggggtgg agaccaccac accctccaaa 180
 caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
 tcccacaaaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtt 300
 gccctacgg aatgttcata g 321

15 <210> 69

<211> 120

<212> PRT

20

<213> humano

<400> 69

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

<210> 70

30 <211> 360

<212> ADN

ES 2 689 782 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de nucleótidos optimizada

<400> 70

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| | caagttcaac | tacaagaatc | cgggcggcggc | ctggtgcagc | ccggcggctc | cctgaggctg | 60 |
| | tcttgcgccg | cctccggctt | ctccttcaac | acctacacca | tgcactgggt | caggcaggcc | 120 |
| | cccggcaagg | gcctggagtg | ggtggccgac | atcgctacg | acggctccac | caagtactac | 180 |
| | gccgactccg | tgaagggcag | gttcaccatc | tccagggaca | acgccaagaa | ctccctgtac | 240 |
| | ctgcagatga | actccctgag | ggccgaggac | accgccgtgt | actactgcdc | cagggacgcc | 300 |
| 10 | gtggccggcg | agggctactt | cgacctgtgg | ggcaggggca | ccctggtgac | cgtgtcctcc | 360 |

<210> 71

<211> 214

15

<212> PRT

<213> humano

20 <400> 71

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

<210> 72

25

<211> 645

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 689 782 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de nucleótidos optimizada

<400> 72

5 caatcagcac taacacaaga ccccgccgtg tccgtggccc tgggccagac cgtgaggatc 60
 acctgccagg gcgactccct gaggtcctac tacgcctcct ggtaccagca gctgcccggc 120
 accgccccca agctgctgat ctaccgcaac aaccagaggc cctccggcgt gcccgaccgc 180
 ttctccggct ccaagtccgg cacctccgcc tccctggcca tctccggcct gaggtccgag 240
 gacgaggccg actactactg cgccgcctgg gacgactccc tgtccgcctg ggtgttcggc 300
 ggcggcacca agctgaccgt gctggggccag cccaaggccg ccccctccgt gaccctgttc 360
 cccccctcct ccgaggagct gcaggccaac aaggccaccc tgggtgtgcct gatctccgac 420
 ttctaccccc gcgccgtgac cgtggcctgg aaggccgact cctccccctg gaaggccggc 480
 gtggagacca ccacccctc caagcagtc aacaacaaat acgccgcctc ctctacctg 540
 tccctgacct ccgagcagtg gaagtccac aagtcctact cctgcccaagt caccacagag 600
 ggctccaccg tggagaagac cgtggccccc accgagtgct cctga 645

<210> 73

10 <211> 120

<212> PRT

15 <213> humano

<400> 73

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

20 <210> 74

<211> 360

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de nucleótidos optimizada

<400> 74

ES 2 689 782 T3

```

caagttcaac tacaagaatc cggcggcggc gtggtgcagc ccggcaggtc cctgaggctg      60
tctgcgccc cctcccgtt caccttctcc tcctacgcca tgcaactgggt ccgccaagcc      120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggccgtg atctcctacg acggctccaa caagtactac      180
gccgactccg tgaagggcag gttcaccatc tccagggaca actccaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga actccctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg      300
tccggctacg gcgactaccc cgactactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgtcctcc      360

```

<210> 75

5 <211> 212

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 75

```

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

```

15

<210> 76

<211> 639

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de nucleótidos optimizada

<400> 76

ES 2 689 782 T3

```

gaactaacac aagatccagc cgtgtccgtg gccctgggcc agaccgtgag gatcacctgc      60
cagggcgact ccctgaggtc ctactacgcc tcctggtacc agcagaagcc cggccaggcc      120
cccgtgctgg tgatgtacgg caggaacgag aggcctccg gcgtgcccg cgccttctcc      180
ggctccaagt cgggcacctc cgcctccctg gccatctccg gcctgcagcc cgaggacgag      240
gccaactact actgcgccgg ctgggacgac tccctgaccg gcccctgttt cggcggcggc      300
accaagctga ccgtgctggg ccagcccaag gccgccccct ccgtgaccct gttccccccc      360
tcctccgagg agctgcaggc caacaaggcc accctgggtg gcctgatctc cgacttctac      420
cccggcgccg tgaccgtggc ctggaaggcc gactcctccc ccgtgaaggc cggcgtggag      480
accaccaccc cctccaagca gtccaacaac aaatacgccg cctcctccta cctgtccctg      540
acccccgagc agtgggaagtc ccacaagtcc tactcctgcc aagtcaccca cgagggtcc      600
accgtggaga agaccgtggc ccccaccgag tgctcctga      639
    
```

<210> 77

5 <211> 330

<212> PRT

<213> humano

10

<400> 77

```

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

ES 2 689 782 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | |
| Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | | |
| | | 290 | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | |
| Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | |
| Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys | | | | | | | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | | | | |

<210> 78

5 <211> 993

<212> ADN

<213> humano

10

<400> 78

```

gcctccacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccct cctccaagtc cacctccggc      60
ggcaccgccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc      120
tggaactccg gcgccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagtctctc      180
ggcctgtact ccctgtcctc cgtggtgacc gtgccctcct cctccctggg caccagacc      240
tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc      300
aagtcctgcy acaagaccca cacctgcccc cctgccccg cccccgagct gctgggcggc      360
ccctccgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatctc ccgaccccc      420
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgtcc cacgaggacc ccgaggtgaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagggagga gcagtacaac      540
tccacctaca ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag      600
gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgccgccc ccatcgagaa gaccatctcc      660
aaggccaagg gccagcccag ggagccccag gtgtacacc tgcccccctc ccgcgacgag      720
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctacc ctccgacatc      780
gccgtggagt gggagtccaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccgctg      840
ctggactccg acggctcctt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg      900
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc      960
cagaagtccc tgtccctgtc ccccggaag tga

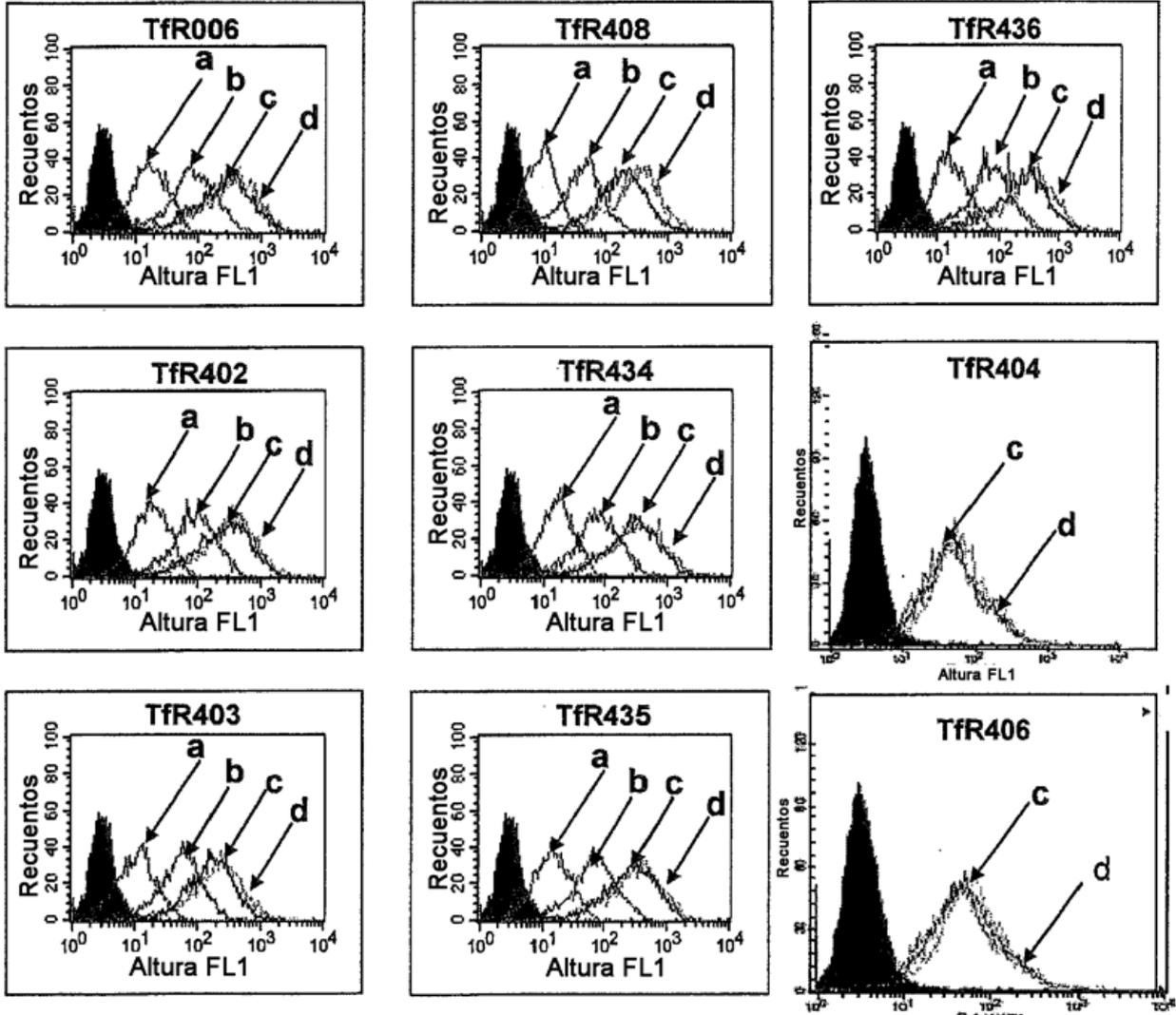
```

REIVINDICACIONES

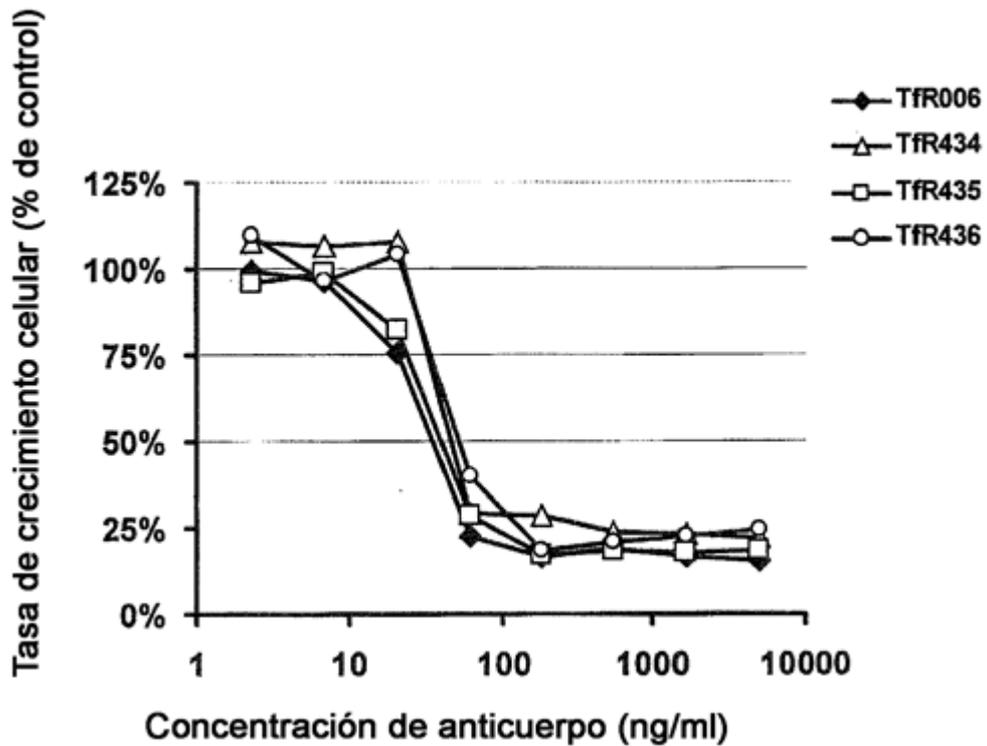
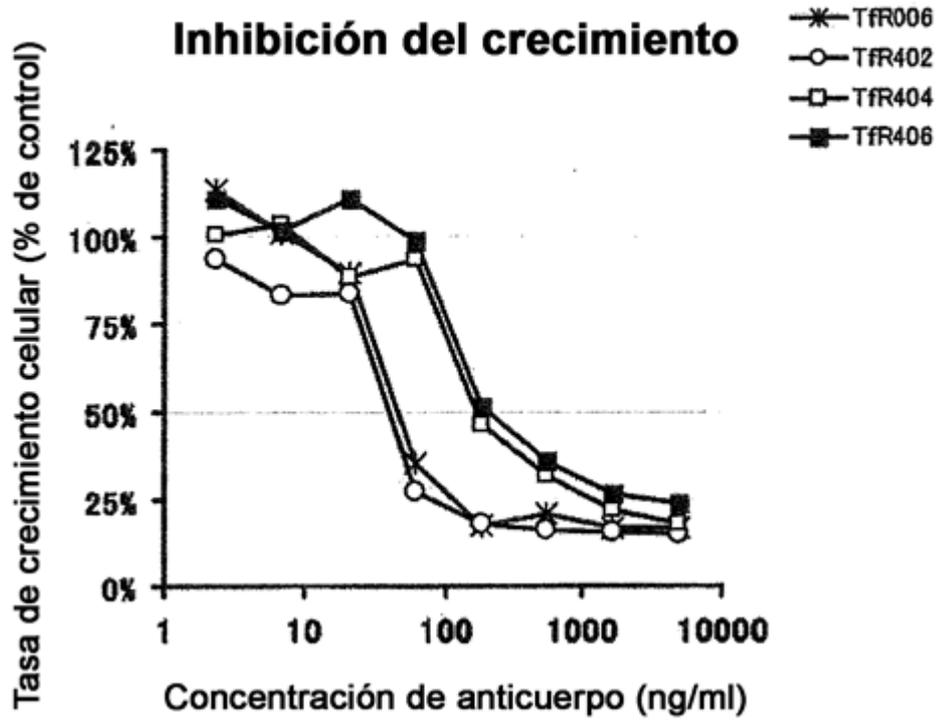
1. Anticuerpo que reacciona específicamente con Tfr humano, que se selecciona de los siguientes (1), (3), (4), (33) y (34):
- 5
- (1) Un anticuerpo, en el que la primera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR1 de VH), la segunda región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR2 de VH) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR3 de VH) corresponden a SEQ ID NO: 1, 2 y 7, respectivamente, y la primera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR1 de VL), la segunda región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR2 de VL) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR3 de VL) corresponden a SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente;
- 10
- (3) Un anticuerpo, en el que la primera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR1 de VH), la segunda región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR2 de VH) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR3 de VH) corresponden a SEQ ID NO: 1, 2 y 9, respectivamente, y la primera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR1 de VL), la segunda región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR2 de VL) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR3 de VL) corresponden a SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente;
- 15
- (4) Un anticuerpo, en el que la primera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR1 de VH), la segunda región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR2 de VH) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR3 de VH) corresponden a SEQ ID NO: 1, 2 y 10, respectivamente, y la primera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR1 de VL), la segunda región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR2 de VL) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR3 de VL) corresponden a SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente;
- 20
- (33) Un anticuerpo, en el que la primera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR1 de VH), la segunda región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR2 de VH) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR3 de VH) corresponden a SEQ ID NO: 1, 53, 3, respectivamente, y la primera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR1 de VL), la segunda región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR2 de VL) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR3 de VL) corresponden a SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente; y
- 25
- (34) Un anticuerpo, en el que la primera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR1 de VH), la segunda región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR2 de VH) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR3 de VH) corresponden a SEQ ID NO: 1, 54, 3, respectivamente, y la primera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR1 de VL), la segunda región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR2 de VL) y la tercera región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR3 de VL) corresponden a SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente.
- 30
2. Anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
- 35
3. Anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), una región V dimerizada (diacuerpo) y una región V estabilizada por disulfuro (dsFv).
- 40
4. ADN que codifica para el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 45
5. Vector recombinante que comprende el ADN de la reivindicación 4.
- 50
6. Línea celular transformada que se obtiene introduciendo el vector recombinante de la reivindicación 5 en una célula huésped.
- 55
7. Método para producir el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende cultivar la línea celular transformada de la reivindicación 6 en un medio, después permitir que la línea celular genere y acumule el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el cultivo, y después recoger el anticuerpo del cultivo.
- 60
8. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 65

9. Composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que una sustancia citotóxica se une al anticuerpo.
10. Composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la sustancia citotóxica es un fármaco, una toxina o una sustancia radiactiva.
- 5 11. Composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 10 12. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que el cáncer es un cáncer sólido o un cáncer de la sangre.
- 15 13. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que el cáncer sólido es cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer hepático, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de piel.
14. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que el cáncer de la sangre es leucemia, linfoma o mieloma.
- 20 15. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que el cáncer de la sangre es leucemia de células T del adulto (ATL).

[Figura 1]



[Figura 2]



[Figura 3]

```

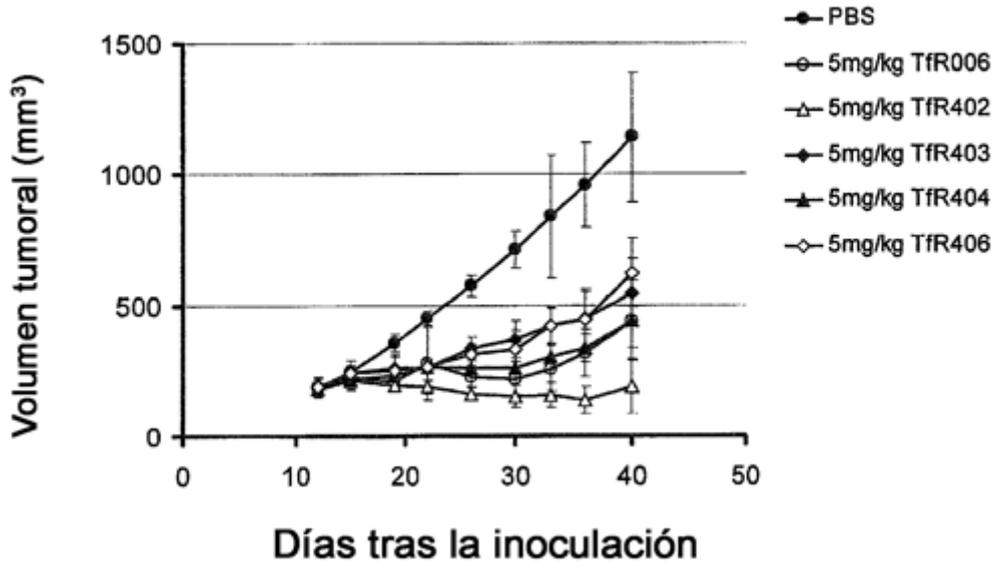
                                     *****
                                     *****
TfR006VH  QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFPFKSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSSKYYADSVKG
           |                               ||                               | |
IGHV3-30  QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
humIII VH  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGDDGGSTYYADSVKG

                                     *****

TfR006VH  RFTISRDNKNTLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDNFWSGYYSPVDVWGQGTITVTVSS
           |
IGHV3-30  RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
           |
humIIIVH  RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGF          DYWGQGLTVTVSS
    
```

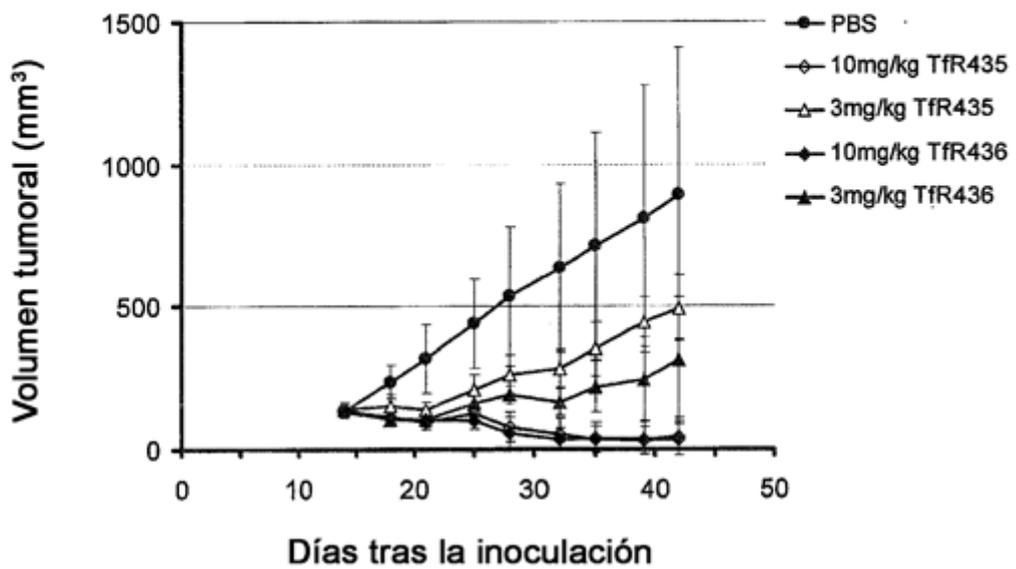
[Figura 4]

Modelo de ATL (SU9T1)

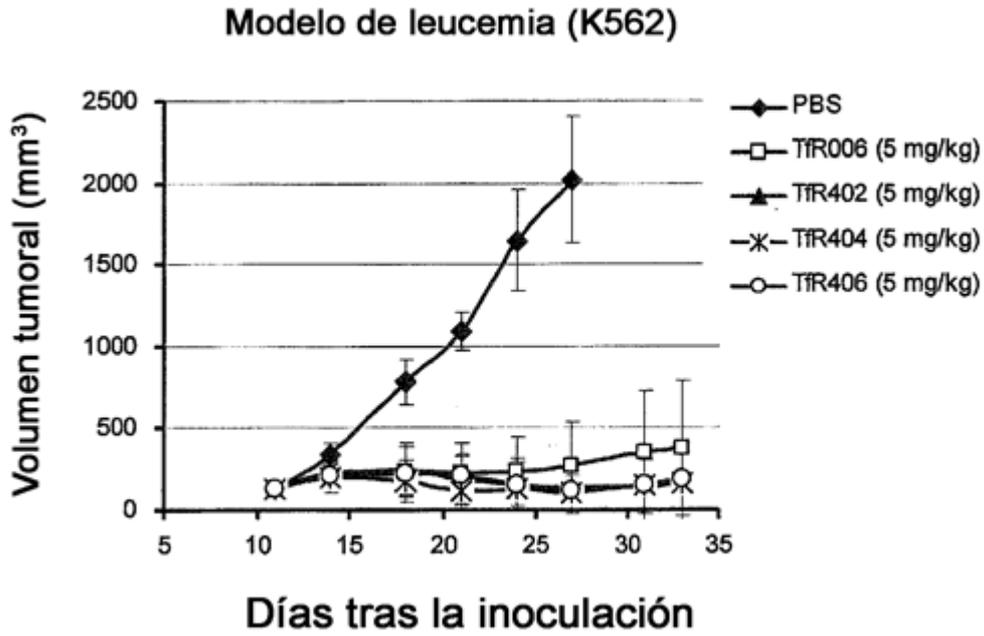


[Figura 5]

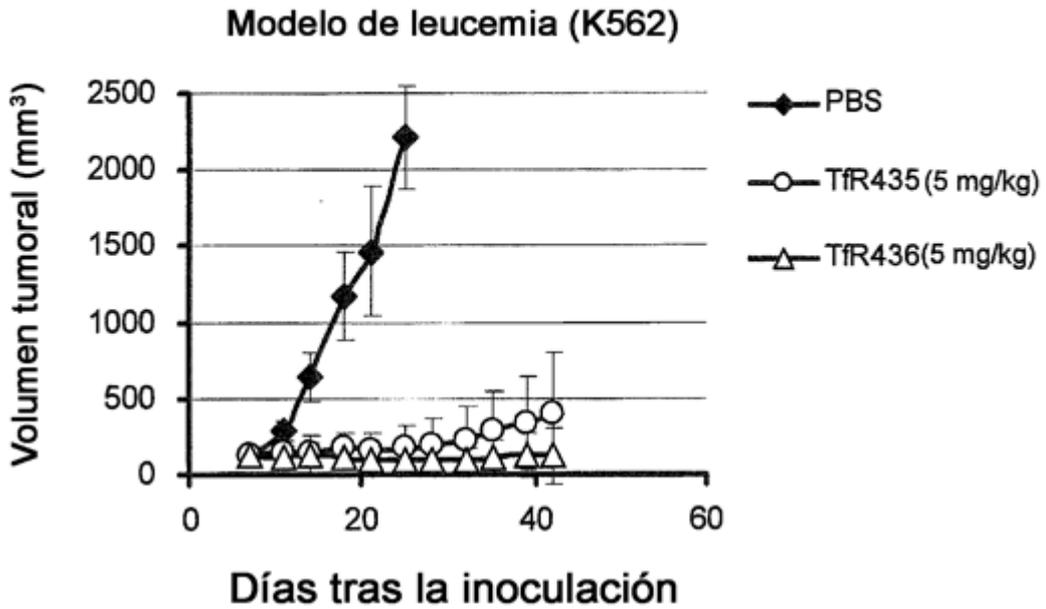
Modelo de ATL (SU9T1)



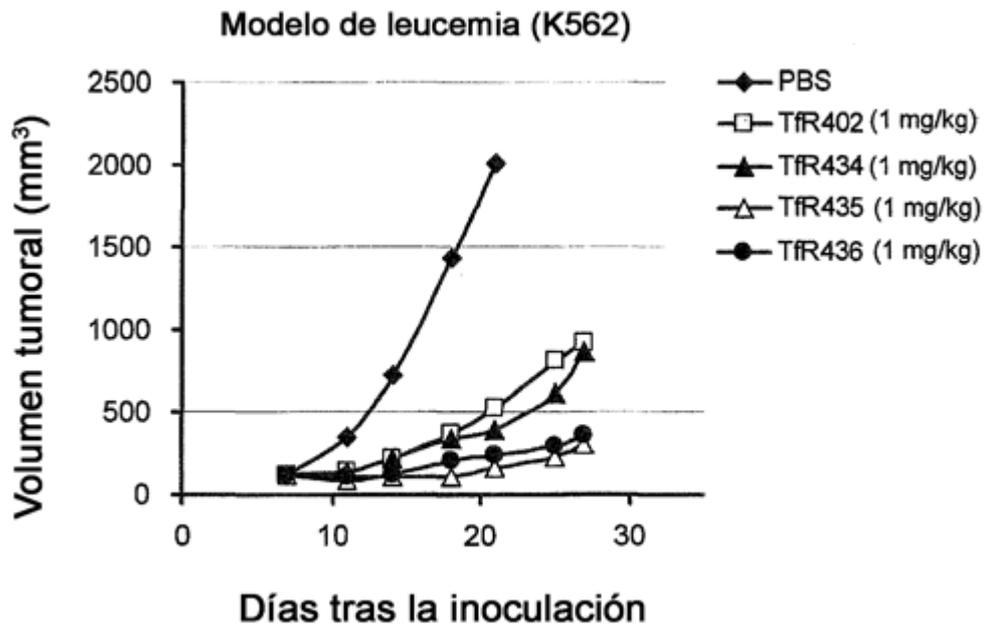
[Figura 6]



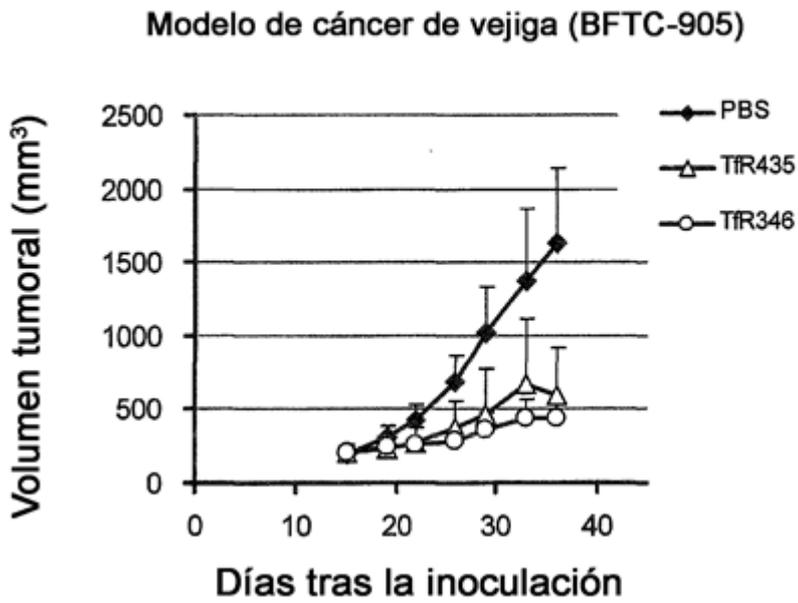
[Figura 7]



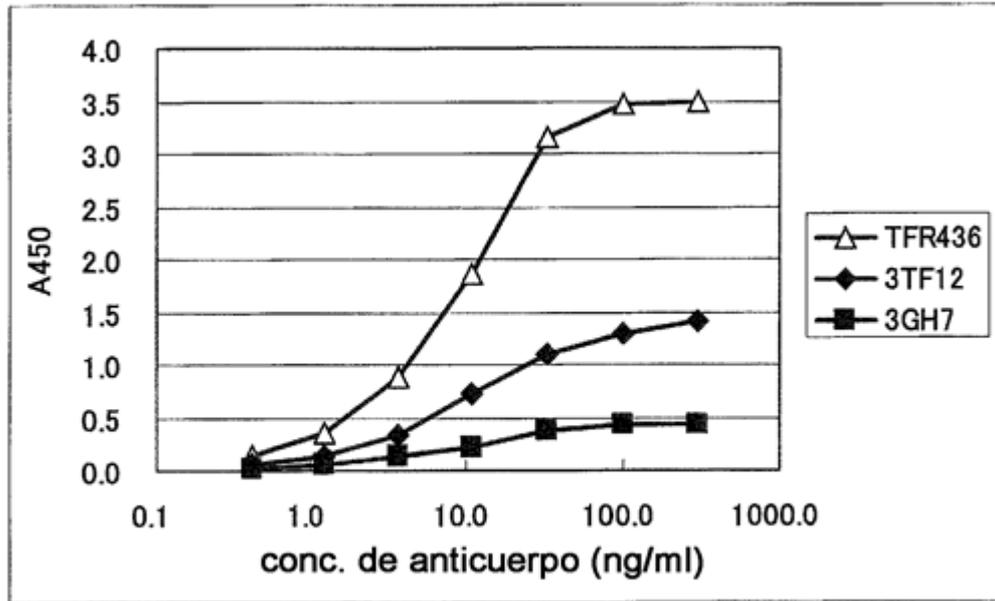
[Figura 8]



[Figura 9]



[Figura 10]



[Figura 11]

