

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 547**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.1999 E 09007161 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2112166**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos para CTLA-4**

30 Prioridad:

23.12.1998 US 113647 P

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

29.03.2019

73 Titular/es:

PFIZER INC. (50.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US y
AMGEN FREMONT INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

HANSON, DOUGLAS CHARLES;
NEVEU, MARK JOSEPH;
MUELLER, EILEEN ELLIOT;
HANKE, JEFFREY HERBERT;
GILMAN, STEVEN CHRISTOPHER;
DAVIS, C. GEOFFREY y
CORVALAN, JOSÉ RAMON

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 706 547 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

Anticuerpos monoclonales humanos para CTLA-4

Antecedentes de la invención**Sumario de la invención**

5 De acuerdo con el presente invento, se proporcionan anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4; del inglés, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) humano. Se proporcionan secuencias nucleotídicas que codifican, y secuencias de aminoácidos que comprenden, moléculas inmunoglobulínicas de cadenas pesadas y ligeras, particularmente secuencias contiguas de cadenas pesadas y ligeras que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs; del inglés, complementarity determining regions), específicamente de en FR1 y/o CDR1 a CDR3 y/o en FR4. Además, se proporcionan anticuerpos que tienen propiedades de unión similares y anticuerpos (u otros antagonistas) que tienen una funcionalidad similar a los anticuerpos descritos en la presente memoria.

Antecedentes de la tecnología

15 La regulación de la respuesta inmune de pacientes proporcionaría un tratamiento deseable de muchas enfermedades humanas que podría conducir a una especificidad de acción que se encuentra raramente mediante el uso de fármacos convencionales. Sería posible tanto la suprarregulación como la infrarregulación de respuestas del sistema inmune. Los papeles de las células T y las células B han sido ampliamente estudiados y caracterizados en relación con la regulación de la respuesta inmune. A partir de estos estudios, parece que, en muchos casos, el papel de las células T es particularmente importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades.

20 Las células T poseen unos sistemas muy complejos para controlar sus interacciones. En las interacciones entre células T se utilizan numerosos receptores y factores solubles para el proceso. De este modo, el efecto que una señal concreta puede ejercer sobre la respuesta inmune generalmente varía y depende de los factores, receptores y contrarceptores concretos que están implicados en la ruta. Las rutas para las respuestas de infrarregulación son tan importantes como las necesarias para la activación. La instrucción tímica que conduce a la tolerancia de las células T es un mecanismo para evitar una respuesta inmune hacia un antígeno concreto. También se conocen otros mecanismos, tal como la secreción de citocinas supresoras.

25 La activación de células T requiere no sólo la estimulación a través del receptor antigénico [receptor de células T (TCR; del inglés, T cell receptor)] sino también una señalización adicional a través de moléculas superficiales coestimulantes, tal como CD28. Los ligandos de CD28 son las proteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), que se expresan en células presentadoras de antígeno (APC; del inglés, antigen-presenting cells) tales como células dendríticas, células B activadas o monocitos que interactúan con CD28 de células T o CTLA-4 para proporcionar una señal coestimulante. El papel de la señalización coestimulante fue estudiado por Perrin et al., Immunol. Res. 14:189-99 (1995) en la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE). La EAE es un trastorno autoinmune provocado por células Th1 dirigidas contra antígenos de mielina, que proporciona un modelo *in vivo* para estudiar el papel de la coestimulación mediada por B7 en la inducción de una respuesta inmune patológica. Utilizando un ligando de proteína de fusión soluble para los receptores de B7, así como anticuerpos monoclonales específicos para CD80 o CD86, Perrin et al. demostraron que la coestimulación de B7 desempeña un papel destacado a la hora de determinar el resultado de la enfermedad clínica en EAE.

30 La interacción entre B7 y CD28 es una de las diversas rutas de señalización coestimulantes que parecen ser suficientes para desencadenar la maduración y proliferación de células T antigénicamente específicas. La falta de coestimulación, y la concomitante insuficiencia en la producción de IL-2, evitan la subsiguiente proliferación de las células T y provocan un estado de falta de reactividad denominado "anergia". Diversos virus y tumores pueden bloquear la activación y proliferación de células T, lo que conduce a una actividad insuficiente o una falta de reactividad del sistema inmune del huésped frente a las células infectadas o transformadas. Entre las diversas alteraciones posibles de células T, la anergia puede ser al menos parcialmente responsable del fracaso del huésped a la hora de eliminar las células patógenas o tumorigénicas.

35 El uso de la proteína B7 para mediar en la inmunidad antitumoral ha sido descrito por Chen et al., Cell 71:1093-1102 (1992), y por Townsend y Allison, Science 259:368 (1993). Schwartz, Cell 71:1065 (1992), ha revisado el papel de CD28, CTLA-4 y B7 en la producción de IL-2 y en inmunoterapia. Harding et al., Nature 356:607-609 (1994), han demostrado que la señalización mediada por CD28 coestimula células T murinas y evita la inducción de anergia en clones de células T. Véanse también las Patentes de EE.UU. números 5.434.131, 5.770.197 y 5.773.253, y las Solicitudes de Patente Internacional números WO 93/00431, WO 95/01994, WO 95/03408, WO 95/24217 y WO 95/33770. En particular, el documento WO 95/33770 proporciona leyendas para la inducción de la apoptosis específica del antígeno en las células.

55 A partir de lo precedente, resultó evidente que las células T requerían dos tipos de señales de la célula presentadora de antígeno (APC) para la activación y la subsiguiente diferenciación a la función efectora. En primer lugar, hay una señal antigénicamente específica generada por interacciones entre el TCR de la célula T y péptidos que presentan

moléculas del MHC en la APC. En segundo lugar, hay una señal antigénicamente independiente que es mediada por la interacción de CD28 con miembros de la familia de B7 [B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86)]. Exactamente, cuando CTLA-4 se mete en el entorno de sensibilidad inmune, es inicialmente evasiva. El CTLA-4 murino fue identificado y clonado por vez primera por Brunet et al., *Nature* 328:267-270 (1987), como parte de una búsqueda de moléculas que se expresan preferentemente en linfocitos T citotóxicos. El CTLA-4 humano fue identificado y clonado poco después por Dariavach et al., *Eur. J. Immunol.* 18:1901-1905 (1988). Las moléculas de CTLA-4 murinas y humanas poseen una homología secuencial global de aproximadamente 76% y sus dominios citoplásmicos se acercan a una identidad secuencial completa [Dariavach et al., *Eur. J. Immunol.* 18:1901-1905 (1988)]. El CTLA-4 es un miembro de la superfamilia inmunoglobulínica (Ig) de proteínas. La superfamilia Ig es un grupo de proteínas que comparten rasgos estructurales esenciales de un dominio variable (V) o constante (C) de moléculas Ig. Los miembros de la superfamilia Ig incluyen, pero no se limitan a, las propias inmunoglobulinas, moléculas de las clases del complejo principal de histocompatibilidad (MHC; del inglés, major histocompatibility complex) (es decir, las clases I y II del MHC), y moléculas de TCR.

En 1991, Linsley et al., *J. Exp. Med.* 174:561-569 (1991), propusieron que CTLA-4 era un segundo receptor de B7. Similarmente, Harper et al., *J. Immunol.* 147:1037-44 (1991), demostraron que las moléculas de CTLA-4 y CD28 están íntimamente relacionadas, tanto en ratón como en ser humano, en cuanto a su secuencia, expresión de mensajes, estructura génica y posición cromosómica. Véase también Balzano et al., *Int. J. Cancer Suppl.* 7:28-32 (1992). Surgió otra evidencia de este tipo a través de estudios funcionales. Por ejemplo, Lenschow et al., *Science* 257:789-792 (1992), demostraron que CTLA-4-Ig provocaba una supervivencia de larga duración de injertos de islotes pancreáticos. Freeman et al., *Science* 262:907-909 (1993), examinaron el papel de CTLA-4 en ratones deficientes en B7. Lenschow et al., *P.N.A.S.* 90:11.054-11.058 (1993), describieron un examen de los ligandos de CTLA-4. Linsley et al., *Science* 257:792-795 (1992), describen la inmunosupresión *in vivo* por una forma soluble de CTLA-4. Linsley et al., *J. Exp. Med.* 176:1595-604 (1992), prepararon anticuerpos que se unían a CTLA-4 y no presentaban reactividad cruzada con CD28, y concluyeron que CTLA-4 se coexpresa con CD28 en linfocitos T activados y regula cooperativamente la adhesión y activación de células T por B7. Kuchroo et al., *Cell* 80:707-18 (1995), demostraron que las moléculas coestimulantes B7-1 y B7-2 activaban diferencialmente las rutas de desarrollo de Th1/Th2. Yi-qun et al., *Int. Immunol* 8:37-44 (1996), demostraron que hay requisitos diferenciales para señales coestimulantes de miembros de la familia de B7 por células T de memoria, en reposo frente a las recientemente activadas, hacia antígenos de recuerdo solubles. Véase también de Boer et al., *Eur. J. Immunol.* 23:3120-5 (1993).

Diversos grupos propusieron interacciones receptor/ligando alternativas o distintas para CTLA-4 en comparación con CD28 e incluso propusieron un tercer complejo de B-7 que era reconocido por un anticuerpo BB1. Véanse, por ejemplo, Hathcock et al., *Science* 262:905-7 (1993), Freeman et al., *Science* 262:907-9 (1993), Freeman et al., *J. Exp. Med.* 178:2185-92 (1993), Lenschow et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11.054-8 (1993), Razi-Wolf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11.182-6 (1993), y Boussiotis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11.059-63 (1993). Pero véase Freeman et al., *J. Immunol.* 161:2708-15 (1998), quienes discutieron el hallazgo de que el anticuerpo BB1 se une a una molécula que es idéntica a la forma de CD74 de la superficie celular y, por lo tanto, el anticuerpo monoclonal (mAb; del inglés, monoclonal antibody) BB1 se une a una proteína distinta de B7-1, y que este epítipo está también presente en la proteína B7-1. De este modo, esta observación requería que los participantes reconsideraran los estudios utilizando el mAb BB1 en el análisis de la expresión y la función de CD80.

Comenzando en 1993 y culminando en 1995, los investigadores empezaron a delinear adicionalmente el papel de CTLA-4 en la estimulación de las células T. En primer lugar, mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra CTLA-4, Walunas et al., *Immunity* 1:405-13 (1994), proporcionaron la evidencia de que CTLA-4 puede actuar como un regulador negativo de la activación de células T. Más tarde, Waterhouse et al., *Science* 270:985-988 (1995), demostraron que ratones deficientes en CTLA-4 acumulaban blastos de células T con marcadores de activación suprarregulados en sus ganglios linfáticos y sus bazo. Los blastos también se infiltraban en el hígado, el corazón, el pulmón y el tejido pancreático, las cantidades de inmunoglobulina sérica estaban elevadas y sus células T proliferaban espontánea e intensamente cuando eran estimuladas a través del receptor de células T; sin embargo, eran sensibles a la muerte celular provocada por entrecruzamiento del receptor Fas y por exposición a radiación gamma. Waterhouse et al. concluyeron que CTLA-4 actúa como un regulador negativo de la activación de células T y es vital para el control de la homeostasis linfocitaria. En un comentario en la misma publicación, Allison y Krummel, *Science* 270:932-933 (1995), discutían el trabajo de Waterhouse et al. como demostrativo de que CTLA-4 actúa para infrarregular la sensibilidad de las células T o tiene un papel de señalización inhibitoria en la activación y desarrollo de células T. Tivol et al., *Immunity* 3:541-7 (1995), también generaron ratones deficientes en CTLA-4 y demostraron que dichos ratones desarrollan rápidamente enfermedad linfoproliferativa con infiltración linfocitaria multiorgánica y destrucción tisular, con miocarditis y pancreatitis particularmente graves. Concluyeron que CTLA-4 desempeña un papel esencial en la infrarregulación de la activación de las células T y en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Además, Kummel y Allison. *J. Exp. Med.* 182:459-65 (1995), también aclararon que CD28 y CTLA-4 ejercen efectos opuestos sobre la respuesta de las células T a la estimulación. Generaron un anticuerpo contra CTLA-4 e investigaron los efectos de su unión a CTLA-4 en un sistema utilizando células T muy purificadas. En su informe, mostraron que la presencia de bajos niveles de B7-2 en células T recién explantadas puede inhibir parcialmente la proliferación de células T y que esta inhibición estaba mediada por interacciones con CTLA-4. El entrecruzamiento de CTLA-4 con el TCR y CD28 inhibe intensamente la proliferación y la secreción de IL-2 por

células T. Finalmente, los resultados mostraron que CD28 y CTLA-4 proporcionan señales opuestas que parecen ser integradas por la célula T a la hora de determinar la respuesta a un antígeno. De esta manera, concluyeron que el resultado de la estimulación del receptor antigénico de células T es regulado por señales coestimulantes de CD28 así como por señales inhibitorias derivadas de CTLA-4. Véanse también Kummel et al., *Int. Immunol.* 8:519-23 (1996), la Patente de EE.UU. n° 5.811.097 y la Solicitud de Patente Internacional n° WO 97/20574.

Se han llevado a cabo diversos experimentos adicionales que elucidan adicionalmente la anterior función de CTLA-4. Por ejemplo, Walunas et al., *J. Exp. Med.* 183:2541-50 (1996), mediante el uso de anticuerpos anti-CTLA-4, sugirieron que la señalización de CTLA-4 no regula la supervivencia celular ni la sensibilidad a IL-2 pero inhibe la producción de IL-2 dependiente de CD28. Además, Perrin et al., *J. Immunol.* 157:1333-6 (1996), demostraron que, en la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), anticuerpos anti-CTLA-4 exacerbaban la enfermedad y potenciaban la mortalidad. La exacerbación de la enfermedad estaba asociada con una producción aumentada de las citocinas encefalitogénicas TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2. De este modo, concluyeron que CTLA-4 regula la intensidad de la respuesta autoinmune en la EAE, atenuando la producción de citocinas inflamatorias y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Véanse también Hurwitz et al., *J. Neuroimmunol.* 73:57-62 (1997), y Cepero et al., *J. Exp. Med.* 188:199-204 (1998) (una ribozima de horquilla anti-CTLA-4 que suprime específicamente la expresión de CTLA-4 después de una transferencia génica en modelo murinos de células T).

Además, Blair et al., *J. Immunol.* 160:12-5 (1998), evaluaron los efectos funcionales de un conjunto de anticuerpos monoclonales (mAbs) contra CTLA-4 sobre células T CD4+ humanas en reposo. Sus resultados demostraron que algunos mAbs contra CTLA-4 podían inhibir respuestas proliferativas de células CD4+ en reposo y la transición del ciclo celular de G0 a G1. Los efectos inhibitorios de CTLA-4 eran evidentes a las 4 horas, un momento en que la expresión de CTLA-4 en la superficie celular permanecía indetectable. Sin embargo, otros mAbs contra CTLA-4 no ejercían efectos inhibitorios detectables, lo que indicaba que la unión de mAbs sólo a CTLA-4 no era suficiente para mediar en la infrarregulación de las respuestas de las células T. Es interesante resaltar que, mientras la producción de IL-2 estaba cortada, los mAbs inhibitorios anti-CTLA-4 permitían la inducción y expresión del gen bcl-X (L) de la supervivencia celular. Consistentemente con esta observación, las células permanecían viables y no se detectaba apoptosis después de la ligación de CTLA-4. El documento WO 98/42752 proporciona péptidos que se unen a CTLA-4 y co-estimulan la proliferación de células T mediante la inhibición de la unión de B7 a CTLA-4.

En relación con la anergia, Pérez et al., *Immunity* 6:411-7 (1997), demostraron que se evitaba la inducción de la anergia de células T mediante el bloqueo de CTLA-4 y concluyeron que el resultado del reconocimiento antigénico por las células T está determinado por la interacción de CD28 o CTLA-4, en las células T, con moléculas de B7. Además, Van Parijs et al., *J. Exp. Med.* 186:1119-28 (1997), examinaron el papel de la interleucina 12 y de coestimulantes en la anergia de células T *in vivo* y hallaron que, mediante la inhibición de la participación de CTLA-4 durante la inducción de la anergia, se bloqueaba la proliferación de células T y no se activaba la diferenciación completa de Th1. Sin embargo, las células T expuestas a un antígeno tolerogénico en presencia tanto de IL-12 como de un anticuerpo anti-CTLA-4 no resultaban anergizadas y se comportaban idénticamente a las células T que se han encontrado con un antígeno inmunogénico. Estos resultados sugerían que contribuyen dos procesos a la inducción de anergia *in vivo*: la participación de CTLA-4, que conduce a un bloqueo de la capacidad de las células T para proliferar, y la ausencia de una citocina inflamatoria prototípica, IL-12, que evita la diferenciación de las células T en células efectoras Th1. La combinación de IL-12 y un anticuerpo anti-CTLA-4 era suficiente para convertir un estímulo normalmente tolerogénico en uno inmunogénico.

En relación con infecciones, McCoy et al., *J. Exp. Med.* 186:183-7 (1997), demostraron que anticuerpos anti-CTLA-4 potenciaban y aceleraban en gran medida la respuesta inmune de células T a *Nippostrongylus brasiliensis*, lo que daba lugar a una profunda reducción del número de gusanos adultos y a la terminación precoz de la producción de huevos del parásito. Véase también Murphy et al., *J. Immunol.* 161:4153-4160 (1998) (*Leishmania donovani*).

En relación con el cáncer, Kwon et al., *PNAS USA* 94:8099-103 (1997), establecieron un modelo de cáncer de próstata murino singénico y examinaron dos distintas manipulaciones destinadas a provocar una respuesta anticáncer de próstata por medio de una coestimulación potenciada de células T: (i) provisión de una coestimulación directa por células de cáncer de próstata transducidas para que expresaran el ligando de B7-1, y (ii) bloqueo *in vivo* de CTLA-4 de células T, mediado por anticuerpos, que evita la infrarregulación de las células T. Se demostró que el bloqueo *in vivo* de CTLA-4, mediado por anticuerpos, potenciaba respuestas inmunes anticáncer de próstata. Además, Yang et al., *Cancer Res.* 57:4036-41 (1997), investigaron si el bloqueo de la función de CTLA-4 conduce a la potenciación de respuestas antitumorales de células T en diversas fases de crecimiento tumoral. Basándose en los resultados *in vitro* e *in vivo*, hallaron que el bloqueo de CTLA-4 en los individuos portadores de tumor potenciaba la capacidad para generar respuestas antitumorales de células T, pero, en su modelo, la expresión de dicho efecto potenciador estaba restringida a las fases precoces del crecimiento tumoral. Además, Hurwitz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:10.067-71 (1998), investigaron la generación de una respuesta antitumoral mediada por células T, que depende de la participación del receptor de células T, por el complejo principal de histocompatibilidad/antígeno así como por la ligación de CD28 por B7. Ciertos tumores, tal como el carcinoma mamario SM1, resultaron refractarios a la inmunoterapia con anti-CTLA-4. De este modo, mediante el uso de una combinación del bloqueo de CTLA-4 y una vacuna que consistía en células SM1 que expresaban el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, se observó la regresión de tumores SM1 parentales a pesar de la ineficacia de cualquier de los dos tratamientos solo. Esta terapia de combinación daba lugar a una inmunidad

de larga duración hacia SM1 y dependía de células T tanto CD4(+) como CD8 (+). Los hallazgos sugerían que el bloqueo de CTLA-4 actúa a nivel de una célula presentadora de antígeno derivada del huésped.

5 En relación con la diabetes, Luhder et al., J. Exp. Med. 187:427-32 (1998), inyectaron un mAb anti-CTLA-4 a un modelo de diabetes en ratón transgénico para TCR, en diferentes fases de la enfermedad. Hallaron que la participación de CTLA-4 en el momento en que se activan por vez primera células T potencialmente diabetogénicas es un proceso esencial; si se permite la participación, se produce la invasión de los islotes, aunque permanece bastante inocua durante meses. En caso contrario, la insulinitis es mucho más agresiva y se origina rápidamente una diabetes.

10 En relación con una inmunización por vacuna, Horspool et al., J. Immunol. 160:2706-14 (1998), hallaron que un mAb anti-CTLA-4 intacto, pero no los fragmentos Fab, suprimía la respuesta humoral primaria a pCIA/beta gal sin afectar a las respuestas de recuerdo, lo que indicaba que la activación de CTLA-4 inhibía la producción de Ab pero no la estimulación primaria de células T. El bloqueo de los ligandos de CD28 y CTLA-4, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), reveló una función distinta y no solapante. El bloqueo de CD80 en la inmunización inicial suprimía completamente las respuestas primarias y secundarias de Ab, mientras que el bloqueo de CD86 suprimía las respuestas primarias pero no las secundarias. El bloqueo simultáneo de CD80 y CD86 era menos eficaz en cuanto a suprimir las respuestas de Ab que el de cualquiera de los dos solo. La potenciación de la coestimulación por medio de la coinyección de plásmidos que expresaban B7 aumentaba las respuestas de CTL pero no las respuestas de Ab, y sin evidencia de sesgo Th1 a Th2. Estos hallazgos sugieren papeles complejos y distintos para CD28, CTLA-4, CD80 y CD86 en la coestimulación de células T después de una vacunación con ácido nucleico.

20 En relación con el rechazo de aloinjertos, Markees et al., J. Clin. Invest. 101:2446-55 (1998), hallaron en un modelo de rechazo de aloinjertos de piel en ratón que la aceptación dependía inicialmente de la presencia de IFN-gamma, CTLA-4 y células T CD4(+). La adición de un mAb anti-CTLA-4 o anti-IFN-gamma al protocolo se asoció con un inmediato rechazo de injertos, mientras que un mAb anti-IL-4 no produjo efecto alguno.

25 Con respecto al papel de CTLA-4 en relación con CD28, Fallarino et al., J. Exp. Med. 188:205-10 (1998), generaron ratones deficientes en CD28 o de tipo silvestre para CD28/deficientes en el gen 2 activador de la recombinasa/transgénicos para TCR que fueron inmunizados con un tumor que expresaba antígeno. Las células T primariamente estimuladas de ambos tipos de ratones producían citocinas y proliferaban en respuesta a células de estimulación que carecían de expresión de B7. Sin embargo, mientras que la respuesta de las células T CD28+/+ resultaba aumentada por la coestimulación con B7-1, la respuesta de las células T CD28-/- resultaba fuertemente inhibida. Esta inhibición era invertida mediante un anticuerpo monoclonal contra B7-1 o CTLA-4. De esta manera, CTLA-4 puede inhibir potentemente la activación de las células T en ausencia de CD28, lo que indica que el antagonismo de una señal mediada por TCR es suficiente para explicar el efecto inhibitorio de CTLA-4. Además, Lin et al., Exp. Med. 188:199-204 (1998), estudiaron el rechazo de aloinjertos de corazón en ratones deficientes en CD28. Se trasplantaron corazones H-2(q) a ratones alogénicos de tipo silvestre o deficientes en CD28 [H-2(b)]. El rechazo del injerto resultó retrasado en los ratones deficientes en CD28 en comparación con los de tipo silvestre. El tratamiento de los ratones receptores de tipo silvestre con CTLA-4- inmunoglobulina (Ig), o con mAbs anti-B7-1 más anti-B7-2 prolongaba significativamente la supervivencia de los aloinjertos. Por contraste, el tratamiento de los ratones deficientes en CD28 con CTLA-4-Ig, mAbs anti-B7-1 más anti-B7-2, o un mAb anti-CTLA-4 bloqueante inducía la aceleración del rechazo de los aloinjertos. Esta velocidad aumentada del rechazo de los injertos se asoció con una infiltración de células mononucleares más intensa y con unos niveles aumentados de transcritos de IFN-gamma e IL-6 en los corazones de donante de los ratones de tipo silvestre no tratados y de los ratones deficientes en CD28 tratados con CTLA-4-Ig o mAb anti-CTLA-4. De este modo, el papel regulador negativo de CTLA-4 se extiende más allá de su potencial capacidad para prevenir la activación de CD28 a través de la competición de los ligandos. Incluso en ausencia de CD28, CTLA-4 desempeña un papel inhibitorio en la regulación del rechazo de aloinjertos.

45 Además, se ha investigado una caracterización más de la expresión de CTLA-4. Por ejemplo, Alegre et al., J. Immunol. 157:4762-70 (1996), propusieron que el CTLA-4 superficial es rápidamente internalizado, lo que puede explicar los bajos niveles de expresión generalmente detectados en la superficie celular. Concluyeron que tanto CD28 como IL-2 desempeñan papeles importantes en la suprarregulación de la expresión de CTLA-4. Además, parece que la acumulación de CTLA-4 en la superficie celular es principalmente regulada por su rápida endocitosis. Además, Castan et al., Immunology 90:265-71 (1997), basándose en análisis inmunohistológicos *in situ* de la expresión de CTLA-4, sugirieron que células T de centros germinales, que eran positivas para CTLA-4, podrían ser importantes para la regulación inmune.

55 En consecuencia, a la vista del amplio y esencial papel que parece poseer CTLA-4 en la sensibilidad inmune, sería deseable generar anticuerpos hacia CTLA-4 que pudieran ser eficazmente utilizados en inmunoterapia. Además, sería deseable generar anticuerpos contra CTLA-4 que pudieran ser utilizados en enfermedades crónicas en que se requieren administraciones repetidas de los anticuerpos.

Breve descripción de las figuras de los dibujos

La Figura 1 proporciona una serie de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las moléculas inmunoglobulínicas

de cadenas pesadas y cadenas ligeras kappa de acuerdo con la invención 4.1.1 (Figura 1A), 4.8.1 (Figura 1B), 4.14.3 (Figura 1C), 6.1.1 (Figura 1D), 3.1.1 (Figura 1E), 4.10.2 (Figura 1F), 2.1.3 (Figura 1G), 4.13.1 (Figura 1H), 11.2.1 (Figura 1I), 11.6.1 (Figura 1J), 11.7.1 (Figura 1K), 12.3.1.1 (Figura 1L) y 12.9.1.1 (Figura 1M).

5 La Figura 2 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-50 (3-33). Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de DP-50 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos en forma sombreada.

10 La Figura 3 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena pesada del clon 2.1.3 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-65 (4-31). Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de DP-65 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

15 La Figura 4 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras kappa de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 4.10.2 y 4.13.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A27. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A27 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada. Las aparentes deleciones en los CDR1s de los clones 4.8.1, 4.14.3 y 6.1.1 se indican con "0s".

20 La Figura 5 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras kappa de los clones 3.1.1, 11.2.1, 11.6.1 y 11.7.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal 012. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de 012 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

25 La Figura 6 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 2.1.3 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A10/A26. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A10/A26 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

30 La Figura 7 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 12.3.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A17. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A17 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

35 La Figura 8 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 12.9.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A3/A19. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A3/A19 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 9 proporciona un resumen de secuencias de aminoácidos N-terminales generadas mediante la secuenciación proteica directa de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos.

40 La Figura 10 proporciona cierta información caracterizadora adicional acerca de ciertos de los anticuerpos de acuerdo con la invención. En la Figura 10A, se resumen datos relacionados con los clones 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.14.3 y 6.1.1. Se proporcionan datos relacionados con concentración, enfoque isoeléctrico (IEF; del inglés, isoelectric focusing), electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE; del inglés, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC; del inglés, size exclusion chromatography), cromatografía en fase líquida/espectroscopia de masas (LCMS; del inglés, liquid chromatography/mass spectroscopy), espectroscopia de masas (MALDI) y secuencias N-terminales de cadenas ligeras. Se proporciona información detallada adicional relacionada con IEF en la Figura 10B; relacionada con SDS-PAGE en la 10C; y relacionada con SEC del anticuerpo 4.1.1 en la 10D.

La Figura 11 muestra la expresión de B7-1 y B7-2 en células Raji utilizando mAbs anti-CD80-PE y anti-CD86-PE.

La Figura 12 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IL-2 en el ensayo con blastos de células T/Raji, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 (BNI3, 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1).

50 La Figura 13 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IFN- γ en el ensayo con blastos de células T/Raji, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 (BNI3, 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1) (mismas células T de donante).

La Figura 14 muestra la potenciación media de la producción de IL-2 en células T de 6 donantes, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 en el ensayo con blastos de células T/Raji.

La Figura 15 muestra la potenciación media de la producción de IFN- γ en células T de 6 donantes, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 en el ensayo con blastos de células T/Raji.

5 La Figura 16 muestra la potenciación de la producción de IL-2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC; del inglés, peripheral blood mononuclear cells) humanas de 5 donantes, inducida por mAbs bloqueantes anti-CTLA-4 según se mide a las 72 horas después de una estimulación con SEA.

La Figura 17 muestra la potenciación de la producción de IL-2 en sangre completa de 3 donantes, inducida por mAbs bloqueantes anti-CTLA-4 según se mide a las 72 y 96 horas después de una estimulación con SEA.

La Figura 18 muestra la inhibición del crecimiento tumoral con un anticuerpo anti-CTLA-4 murino en un modelo de tumor de fibrosarcoma murino.

10 La Figura 19 muestra la potenciación de la producción de IL-2, inducida por anticuerpos anti-CTLA4 (4.1.1 y 11.2.1) de la invención en unos ensayos de 72 horas con blastos T/Raji y superantígeno (sangre completa y células mononucleares de sangre periférica de 6 donantes).

La Figura 20 muestra la potenciación, dependiente de la dosis, de la producción de IL-2 inducida por anticuerpos anti-CTLA4 (4.1.1 y 11.2.1) de la invención en un ensayo de 72 horas con blastos T/Raji.

15 La Figura 21 muestra la potenciación, dependiente de la dosis, de la producción de IL-2 inducida por anticuerpos anti-CTLA4 (4.1.1 y 11.2.1) de la invención en un ensayo de 72 horas con sangre completa y superantígeno, estimulado con 100 ng/ml de superantígeno.

20 La Figura 22 proporciona una serie de secuencias adicionales de nucleótidos y aminoácidos de las siguientes cadenas de anticuerpo anti-CTLA-4: cadena pesada de 4.1.1 de longitud completa [ADNc 22(a), ADN genómico 22(b) y aminoácidos 22(c)], cadena pesada de 4.1.1 aglicosilada de longitud completa [ADNc 22(d) y aminoácidos 22(e)], cadena ligera de 4.1.1 [ADNc 22(f) y aminoácidos 22(g)], cadena pesada de 4.8.1 de longitud completa [ADNc 22(h) y aminoácidos 22(i)], cadena ligera de 4.8.1 [ADNc 22(j) y aminoácidos 22(k)], cadena pesada de 6.1.1 de longitud completa [ADNc 22(l) y aminoácidos 22(m)], cadena ligera de 6.1.1 [ADNc 22(n) y aminoácidos 22(o)], cadena pesada de 11.2.1 de longitud completa [ADNc 22(p) y aminoácidos 22(q)], y cadena ligera de 11.2.1 [ADNc 22(r) y aminoácidos 22(s)].

Sumario de la invención

La invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones. Así, se refiere a un anticuerpo monoclonal humano que se une a CTLA-4, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento compete para unirse a CTLA-4 con un anticuerpo de referencia que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 9 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a ella y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 22 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a ella, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene las siguientes propiedades: a) una afinidad de unión por CTLA-4 de 10^{-9} M o mayor según determina BIAcore; b) inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con una IC_{50} de 100 nM o menor; y c) inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con una IC_{50} de 100 nM o menor. Adicionalmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en particular para el tratamiento del cáncer. Por otra parte, proporciona un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de cadena ligera y pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Además, la invención proporciona un método para la producción del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de la invención que comprende expresar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en una línea celular huésped y recuperar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

La invención se refiere a las realizaciones tal como se definen en las reivindicaciones. Así, se refiere a un anticuerpo monoclonal humano que se une a CTLA-4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento compete por unirse a CTLA-4 con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene las siguientes propiedades a) una afinidad de unión por CTLA-4 de 10^{-9} M o mayor según lo determinado por BIAcore; b) inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con una IC_{50} de 100 nM o menor; y c) inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con una IC_{50} de 100 nM o menor, en donde el anticuerpo de referencia se selecciona del grupo que consiste en i) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; ii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18; iii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; iv) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15; v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; vi) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:16; vii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17; viii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23; y ix) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. Adicionalmente, la invención se refiere a un vehículo farmacéuticamente aceptable, en particular para el tratamiento del cáncer. Además, se proporciona un ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Además, la invención proporciona un método para la producción del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención que comprende expresar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en una línea celular huésped y recuperar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal humano aislado que es capaz de unirse a CTLA-4. En una realización preferida, el anticuerpo es capaz de competir por la unión con CTLA-4 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1. En otra realización preferida, el anticuerpo posee una especificidad de unión sustancialmente similar a CTLA-4 como un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1. En otra realización preferida, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1. En otra realización preferida, el anticuerpo no es reactivo cruzado con CTLA-4 de especies de mamíferos inferiores, preferiblemente las especies de mamíferos inferiores comprenden ratón, rata y conejo y más preferiblemente ratón y rata. En otra realización preferida, el anticuerpo es reactivo cruzado con CTLA-4 de primates, preferiblemente los primates comprenden monos cinomolgos y rhesus. En otra realización preferida, el anticuerpo posee una selectividad para CTLA-4 en comparación con CD28, B7-2, CD44 y hlgG1 de más de aproximadamente 100:1 y preferiblemente de aproximadamente 500:1 o mayor. En otra realización preferida, la afinidad de unión del anticuerpo es de aproximadamente 10^{-9} M o mayor y preferiblemente de aproximadamente 10^{-10} M o mayor. En otra realización preferida, el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con una IC_{50} inferior a aproximadamente 100 nM y preferiblemente inferior a aproximadamente 0,38 nM. En otra realización preferida, el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con una IC_{50} menor que aproximadamente 100 nM o mayor y preferiblemente inferior a aproximadamente 0,50 nM. En otra realización preferida, el anticuerpo aumenta la producción de IL-2 en un ensayo de blastos/Raji de células T en aproximadamente 500 pg/ml o más y preferiblemente en aproximadamente 3846 pg/ml o más. En otra realización preferida, el anticuerpo aumenta la producción de IFN- γ en un ensayo de blastos/Raji de células T en aproximadamente 500 pg/ml o más y preferiblemente en aproximadamente 1233 pg/ml o más. En otra realización preferida, el anticuerpo aumenta la producción de IL-2 en un ensayo de hPBMC o superantígeno de sangre completa en aproximadamente 500 pg/ml o más. En otra realización preferida, el anticuerpo aumenta la producción de IL-2 en un ensayo de hPBMC o superantígeno de sangre completa en aproximadamente 500 pg/ml o preferiblemente 1500 pg/ml o más o en más de aproximadamente 30% o preferiblemente 50% con respecto al control.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo humanizado que posee una especificidad de unión sustancialmente similar a CTLA-4 como un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1. En una realización preferida, el anticuerpo no es reactivo cruzado con CTLA-4 de especies de mamíferos inferiores, preferiblemente las especies de mamíferos inferiores comprenden ratón, rata y conejo y preferiblemente ratón y rata. En otra realización preferida, el anticuerpo es reactivo cruzado con CTLA-4 de primates, preferiblemente los primates comprenden monos cinomolgos y rhesus. En otra realización preferida, el anticuerpo posee una selectividad para CTLA-4 en comparación con CD28, B7-2, CD44 y hlgG1 de más de aproximadamente 100:1 y preferiblemente de aproximadamente 500:1 o más. En otra realización preferida, la afinidad de unión del anticuerpo es de aproximadamente 10^{-9} M o mayor y preferiblemente de aproximadamente 10^{-10} M o mayor. En otra realización preferida, el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con una IC_{50} menor que aproximadamente 100 nM y preferiblemente menor que aproximadamente 0,38 nM. En otra realización preferida, el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con una IC_{50} menor que aproximadamente 100 nM o más y preferiblemente menor que aproximadamente 0,50 nM. En otra realización preferida, el anticuerpo aumenta la producción de IL-2 en un ensayo de blastos de células T/Raji en aproximadamente 500 pg/ml o más y preferiblemente en aproximadamente 3846 pg/ml o más. En otra realización preferida, el anticuerpo aumenta la producción de IFN- γ en un ensayo de blastos de células T/Raji en aproximadamente 500 pg/ml o más y preferiblemente en aproximadamente 1233 pg/ml o más. En otra realización preferida, el anticuerpo induce la producción de IL-2 en un ensayo de hPBMC o superantígeno de sangre completa en aproximadamente 500 pg/ml o más. En otra realización preferida, el anticuerpo aumenta la producción de IL-2 en un ensayo de hPBMC o superantígeno de sangre completa en aproximadamente 500 pg/ml o preferiblemente 1500 pg/ml o más o en más que aproximadamente 30% o preferiblemente 50% con respecto al control.

De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une a CTLA-4, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende secuencias de FR1, FR2 y FR3 humanas codificadas por una familia de genes VH 3-33 humana operativamente enlazadas en marco con una

secuencia CDR1, CDR2 y CDR3, seleccionándose las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 independientemente de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 ilustradas en la Figura 2. En una realización preferida, el anticuerpo de la reivindicación 32, comprende además cualquiera de las mutaciones somáticas a las secuencias FR1, FR2 y FR3 como se ilustra en la Figura 2.

5 De acuerdo con un octavo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une a CTLA-4, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende secuencias de FR1, FR2 y FR3 humanas codificadas por una familia de genes VH 3-33 humana operativamente unida en marco con una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3, cuyo anticuerpo tiene las siguientes propiedades: una afinidad de unión por CTLA-4 de aproximadamente 10^{-9} o mayor, inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con una IC_{50} de aproximadamente 100 nM o inferior; inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con un IC_{50} de aproximadamente 100 nM o menor, y aumenta la producción de citoquinas en un ensayo de células T humanas en 500 pg/ml o más.

10 De acuerdo con un noveno aspecto de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une a CTLA-4, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende secuencias de FR1, FR2 y FR3 unidas operativamente en marco con una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionada independientemente de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 ilustradas en las Figuras 2 y 3, cuyo anticuerpo tiene las siguientes propiedades: una afinidad de unión a CTLA-4 de aproximadamente 10^{-9} o más; inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con una IC_{50} de aproximadamente 100 nM o menor; inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con una IC_{50} de aproximadamente 100 nM o menor; y aumenta la producción de citoquinas en un ensayo de células T humanas en 500 pg/ml o más.

15 De acuerdo con un décimo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un sistema de cultivo celular para ensayar la estimulación de células T, que comprende un cultivo de blastos de células T humanas co-cultivadas con una línea celular Raji. En una realización preferida, los blastos de células T se lavan antes del cultivo con la línea celular Raji.

20 De acuerdo con un undécimo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un ensayo para medir la estimulación de células T, que comprende: proporcionar un cultivo de blastos de células T humanas y una línea de células Raji; poner en contacto el cultivo con un agente; y medir la producción de citoquinas por el cultivo.

25 De acuerdo con un duodécimo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un ensayo funcional para seleccionar un resto para la función de estimulación de células T, que comprende: proporcionar un cultivo de blastos de células T humanas y una línea celular Raji; poner en contacto el cultivo con el resto; y evaluar la producción de citoquinas por el cultivo.

30 De acuerdo con un decimotercer aspecto de la presente divulgación, se proporciona un ensayo de estimulación de células T para la función inhibidora de CTLA-4, que comprende poner en contacto un cultivo que comprende blastos de células T humanas y una línea celular Raji con un agente y evaluar la producción de citoquinas por el cultivo.

35 De acuerdo con un decimocuarto aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para seleccionar un agente para la actividad de estimulación de las células T, que comprende: poner en contacto el agente con un cultivo celular que comprende blastos de células T humanas y una línea celular Raji; y evaluar la producción de citoquinas por el cultivo.

40 En cada uno de los aspectos décimo a decimocuarto de la presente divulgación, en una realización preferida, los blastos de células T se lavan antes del cultivo con la línea celular Raji. En otra realización preferida, la citoquina es IL-2 o IFN- γ . En una realización preferida, la producción de citoquinas se mide en sobrenadante aislado del cultivo. En una realización preferida, el agente es un anticuerpo y preferiblemente se une a CTLA-4.

45 De acuerdo con un decimoquinto aspecto de la presente divulgación, se proporciona un ensayo para medir la estimulación de células T, que comprende: proporcionar una población de células mononucleares de sangre periférica humana o sangre completa humana estimulada con enterotoxina A de estafilococo; poner en contacto el cultivo con un agente; y medir la producción de citoquinas por la población celular.

De acuerdo con un decimosexto aspecto de la presente divulgación, se proporciona un ensayo funcional para seleccionar un resto para la función de estimulación de células T, que comprende: proporcionar una población de células mononucleares de sangre periférica humana o sangre completa humana estimulada con enterotoxina A de estafilococo; poner en contacto el cultivo con el resto; y evaluar la producción de citoquinas por la población celular.

50 De acuerdo con un decimoséptimo aspecto de la presente descripción, se proporciona un ensayo de estimulación de células T para la función inhibidora de CTLA-4, que comprende poner en contacto una población de células mononucleares de sangre periférica humana o sangre completa humana estimulada con enterotoxina A de estafilococo con un agente y evaluar la producción de citoquinas por la población celular.

55 De acuerdo con un decimoctavo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para seleccionar un agente para la actividad de estimulación de células T, que comprende: poner en contacto el agente con una población de células mononucleares de sangre periférica humana o sangre completa humana estimulada con

enterotoxina A de estafilococo; y evaluar la producción de citoquinas por la población celular.

En cada uno de los aspectos decimoquinto a decimoctavo de la presente divulgación, en una realización preferida, la citoquina es IL-2. En otra realización preferida, la producción de citoquinas se mide en sobrenadante aislado del cultivo. En una realización preferida, el agente es un anticuerpo y preferiblemente se une a CTLA-4.

5 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

De acuerdo con el presente invento, se proporcionan anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra CTLA-4 humano. Se proporcionan secuencias nucleotídicas que codifican, y secuencias de aminoácidos que comprenden, moléculas inmunoglobulínicas de cadenas pesadas y ligeras, particularmente secuencias que corresponden a secuencias contiguas de cadenas pesadas y ligeras de FR1 y CDR1 a CDR3 y FR4. Además, se proporcionan anticuerpos que tienen propiedades de unión similares y anticuerpos (u otros antagonistas) que tienen una funcionalidad similar a los anticuerpos descritos en la presente memoria. También se proporcionan hibridomas que expresan dichas moléculas inmunoglobulínicas y dichos anticuerpos monoclonales.

Definiciones

A menos que aquí se defina otra cosa, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con el presente invento tendrán los significados que son comúnmente entendidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera otra cosa, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivos celular y tisular, biología molecular, y química e hibridación de proteínas y oligonucleótidos o polinucleótidos aquí descritas son aquéllas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación y lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes o como se desarrollan comúnmente en la técnica o como aquí se describen. Las técnicas y los procedimientos precedentes se llevan generalmente a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y del modo descrito en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" [2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)]. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica aquí descritas son aquéllas bien conocidas y comúnmente utilizadas en este campo técnico. Se utilizan técnicas estándares para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y distribución farmacéuticas, y tratamiento de pacientes.

Se entenderá que, a menos que se indique otra cosa, los términos y expresiones siguientes, como se utilizan de acuerdo con la presente descripción, tienen los significados siguientes:

La expresión "polinucleótido aislado", como aquí se utiliza, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético, o alguna combinación de los mismos; en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con todo, o una porción de, un polinucleótido en el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está operativamente enlazado con un polinucleótido con el que no está enlazado en la naturaleza, o (3) no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

La expresión "proteína aislada", a la que aquí se hace referencia, significa una proteína de ADNc, ARN recombinante u origen sintético, o alguna combinación de los mismos; en virtud de su origen o de la fuente de procedencia, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas halladas en la naturaleza, (2) está exenta de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, exenta de proteínas murinas, (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no se encuentra en la naturaleza.

El término "polipéptido" se utiliza aquí como término genérico para referirse a una proteína nativa, fragmentos, o compuestos análogos de una secuencia polipeptídica. Por lo tanto, proteína nativa, fragmentos y compuestos análogos son especies del género polipéptido. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención comprenden las moléculas inmunoglobulínicas de cadenas pesadas humanas y las moléculas inmunoglobulínicas de cadenas ligeras kappa humanas representadas en la Figura 1, así como las moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas inmunoglobulínicas de cadenas pesadas con moléculas inmunoglobulínicas de cadenas ligeras, tales como las moléculas inmunoglobulínicas de cadenas ligeras kappa, y viceversa, así como fragmentos y compuestos análogos de las mismas.

La expresión "presente en la naturaleza", como aquí se utiliza al aplicarse a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede hallarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus), que puede aislarse de una fuente de la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificada por el hombre en el laboratorio u otro lado está presente en la naturaleza.

La expresión "operativamente enlazado", como aquí se utiliza, se refiere a posiciones de componentes así descritas que están en una relación que les permite actuar del modo previsto. Una secuencia de control "operativamente enlazada" con una secuencia de codificación está ligada de tal modo que la expresión de la secuencia de

codificación se realiza bajo unas condiciones compatibles con la secuencia de control.

La expresión "secuencia de control", como aquí se usa, se refiere a secuencias polinucleotídicas que son necesarias para que se efectúen la expresión y el procesamiento de las secuencias de codificación con las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión ribosómica y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente promotores y una secuencia de terminación de la transcripción. Se pretende que la expresión "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, tales como, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

El término "polinucleótido", al que aquí se hace referencia, significa una forma polímera de nucleótidos con al menos 10 bases de longitud, sea un ribonucleótido o un desoxinucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de cadenas sencilla y doble.

El término "oligonucleótido", al que aquí se hace referencia, incluye nucleótidos presentes en la naturaleza y nucleótidos modificados enlazados entre sí por enlaces oligonucleotídicos presentes en la naturaleza y no presentes en la naturaleza. Los oligonucleótidos son un subconjunto polinucleotídico que comprende generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y, muy preferiblemente, una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 bases. Los oligonucleótidos son normalmente de cadena sencilla, por ejemplo, para sondas, aunque pueden ser de cadena doble, por ejemplo, para uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

La expresión "nucleótidos presentes en la naturaleza", a la que aquí se hace referencia, incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión "nucleótidos modificados", a la que aquí se hace referencia, incluye nucleótidos con grupos azúcar y similares modificados o sustituidos: La expresión "enlaces oligonucleotídicos", a la que aquí se hace referencia, incluye enlaces de oligonucleótido tales como fosforotioato, fosforditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforoanilato, fosforoamidato y similares. Véanse, por ejemplo, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., "Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach", páginas 87-108 [redactado por F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)]; Stec et al., Patente de EE.UU. nº 5.151.510; y Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir, si se desea, una etiqueta para detección.

La expresión "hibridarse selectivamente", a la que aquí se hace referencia, significa unirse detectable y específicamente. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención se hibridan selectivamente con cadenas de ácidos nucleicos bajo unas condiciones de hibridación y lavado que minimizan unas cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos inespecíficos. Se pueden utilizar condiciones de alto rigor para alcanzar unas condiciones de hibridación selectivas, como se conocen en la técnica y aquí se discuten. Generalmente, la homología de secuencias de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de la invención y una secuencia de ácido nucleico de interés será al menos 80% y, más típicamente, con homologías preferiblemente crecientes de al menos 85%, 90%, 95%, 99% y 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa entre ellas. Por ejemplo, una homología de 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias son alineadas para un máximo apareamiento. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que se aparean) para maximizar el apareamiento; se prefieren longitudes de hueco de 5 o menos, siendo más preferidas las longitudes de 2 o menos. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias proteicas (o secuencias polipeptídicas derivadas de ellas, de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, como aquí se usa este término, si tienen una calificación de alineación superior a 5 (en unidades de desviación estándar) al usar el programa ALIGN con la matriz de datos de mutaciones y una penalización por hueco de 6 o más. Véanse M. O. Dayhoff en "Atlas of Protein Sequence and Structure", páginas 101-110 [Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)], y el Suplemento 2 de este volumen, páginas 1-10. Las dos secuencias o partes de ellas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos tienen una identidad mayor o igual a 50% cuando se alinean óptimamente usando el programa ALIGN. La expresión "corresponde a" se usa aquí para significar que una secuencia polinucleotídica es homóloga (es decir, es idéntica, no exactamente relacionada evolutivamente) a toda, o una porción de, una secuencia polinucleotídica de referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia. Por contraste, la expresión "complementaria de" se usa aquí para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda, o una porción de, una secuencia polinucleotídica de referencia. Como ilustración, la secuencia nucleotídica "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria de una secuencia de referencia "GTATA".

Se usan los términos siguientes para describir las relaciones secuenciales entre dos o más secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencias", "porcentaje de identidad de secuencias" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, tal como, por ejemplo, un segmento de una secuencia de ADNc o

génica de longitud completa dada en una enumeración de secuencias, o puede comprender una secuencia de ADNc o génica completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos, frecuentemente una longitud de al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos, y a menudo una longitud de al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos. Puesto que cada uno de dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos (1) puede comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia polinucleotídica o de aminoácidos completa) que sea similar entre las dos moléculas, y (2) puede comprender además una secuencia que sea divergente entre los dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se llevan típicamente a cabo comparando secuencias de las dos moléculas sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud secuencial. Una "ventana de comparación", como aquí se utiliza, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones nucleotídicas contiguas o 6 aminoácidos en el que se puede comparar una secuencia polinucleotídica o una secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos y en el que la porción de la secuencia polinucleotídica de la ventana de comparación puede comprender adiciones, supresiones, sustituciones y similares (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede ser llevada a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo para alineación de homologías de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos [GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA de los paquetes de software de Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, EE.UU.), Geneworks o MacVector], o por inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que da lugar al mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

La expresión "identidad de secuencias" significa que dos secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos son idénticas (es decir, sobre una base de nucleótido-por-nucleótido o de resto-por-resto) sobre la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencias" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en que se encuentra la base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) o el resto idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias. La expresión "identidad sustancial", como aquí se utiliza, significa una característica de una secuencia polinucleotídica o de aminoácidos en que el polinucleótido o los aminoácidos comprenden una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 90 a 95 por ciento, más normalmente una identidad de secuencia de al menos 99 por ciento, en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 18 posiciones nucleotídicas (6 aminoácidos), frecuentemente sobre una ventana de al menos 24-48 posiciones nucleotídicas (8-16 aminoácidos), en que el porcentaje de identidad de secuencias se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia, que puede incluir supresiones o adiciones que totalicen el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia, sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Como aquí se usan, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen la utilización convencional. Véase "Immunology – A Synthesis [2ª edición, redactado por E. S. Golub y D. R. Gren, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EE.UU. (1991)]. Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos artificiales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquil-aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales pueden ser también componentes adecuados para los polipéptidos del presente invento. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación polipeptídica aquí usada, la dirección de la izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección de la derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con la utilización y la convención estándares.

Similarmente, a menos que se especifique otra cosa, el extremo de la izquierda de las secuencias polinucleotídicas de cadena sencilla es el extremo 5'; a la dirección de la izquierda de las secuencias polinucleotídicas de doble cadena se hace referencia como la dirección 5'. A la dirección de la adición 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se hace referencia como la dirección de transcripción; a las regiones secuenciales de la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se hace referencia como "secuencias cadena arriba"; a las regiones secuenciales de la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se hace referencia como "secuencias cadena abajo".

Como se aplica a polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante el programa GAP o BESTFIT usando los pesos de hueco por omisión, comparten una identidad de secuencias de al menos 80 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencias de al menos 90 por ciento, más preferiblemente una identidad de secuencias de al menos 95 por ciento,

y muy preferiblemente una identidad de secuencias de al menos 99 por ciento. Preferiblemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren por sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es el formado por glicocola, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxicas es el formado por serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es el formado por asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es el formado por fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es el formado por lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es el formado por cisteína y metionina. Los grupos preferidos para una sustitución conservativa de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico y asparagina-glutamina.

Como aquí se discute, se contempla que el presente invento abarque variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o las moléculas inmunoglobulínicas, con tal de que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, 90%, 95%, y más preferiblemente 99%. En particular, se contemplan sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas son aquéllas que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados en cuanto a sus cadenas laterales. Los aminoácidos genéticamente codificados se dividen generalmente en familias: (1) ácidos = aspartato y glutamato; (2) básicos = lisina, arginina e histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano; y (4) polares no cargados = glicocola, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. Son familias más preferidas: serina y treonina son una familia alifática-hidroxicas; asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y fenilalanina, triptófano y tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o una valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o un aminoácido similar sustituido por un aminoácido estructuralmente relacionado, no ejerza un efecto importante sobre la unión ni las propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no afecta a un aminoácido de un sitio de armazón. Se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da lugar a un péptido funcional analizando la actividad específica del derivado polipeptídico. Aquí se describen ensayos con detalle. Quienes tienen una experiencia normal en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos de anticuerpos o moléculas inmunoglobulínicas. Los extremos amínicos y carboxílicos preferidos de los fragmentos o compuestos análogos se encuentran cerca de los bordes de dominios funcionales. Se pueden identificar dominios estructurales y funcionales por comparación de los datos de las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferiblemente, se utilizan métodos de comparación informáticos para identificar motivos de secuencias o previstos dominios de conformación proteica que se encuentran en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias proteínicas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida [Bowie et al., Science 253:164 (1991)]. De este modo, los ejemplos precedentes demuestran que quienes tienen experiencia en la técnica pueden reconocer motivos secuenciales y conformaciones estructurales que se pueden utilizar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la invención.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquéllas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteínicos, (4) alteran las afinidades de unión y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos compuestos análogos. Los compuestos análogos pueden incluir diversas mutaciones de una secuencia distinta de la secuencia peptídica presente en la naturaleza. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (preferiblemente sustituciones conservativas de aminoácidos) en la secuencia presente en la naturaleza [preferiblemente en la porción del polipéptido que está fuera del (de los) dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares]. Una sustitución de aminoácido conservativa no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debería tender a romper una hélice que se encuentra en la secuencia parental ni a alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia parental). En "Proteins, Structures and Molecular Principles" [redactado por Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1984)], "Introduction to Protein Structure" [redactado por C. Branden y J. Tooze, Garland Publishing, New York, EE.UU. (1991)], y Thornton et al., Nature 354:105 (1991), se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en la técnica.

La expresión "fragmento polipeptídico", como aquí se utiliza, se refiere a un polipéptido que tiene una supresión amino-terminal y/o carboxi-terminal pero cuya restante secuencia de aminoácidos es idéntica a las correspondientes posiciones de la secuencia presente en la naturaleza y deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADN de longitud completa. Los fragmentos tienen típicamente una longitud de al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos, preferiblemente una longitud de al menos 14 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de al menos 20 aminoácidos, normalmente una longitud de al menos 50 aminoácidos, y aún más preferiblemente una longitud de al menos 70 aminoácidos.

El término "análogo" usado en la presente memoria se refiere a polipéptidos que están comprendidos de un segmento de al menos 25 aminoácidos que tienen identidad sustancial con una parte de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a CTLA-4, bajo condiciones de unión adecuadas, (2) capacidad para bloquear la unión de CTLA-4 con sus receptores, o (3) capacidad para inhibir la expresión el crecimiento celular de CTLA-4 *in vitro* o *in vivo*. Típicamente, los análogos de polipéptidos

comprenden una sustitución de de aminoácidos conservativos (adición o eliminación) con respecto a la secuencia natural.

Los análogos comunes tienen una longitud de al menos 20 aminoácidos, preferiblemente una longitud de al menos 50 aminoácidos, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido natural de longitud completa. Los análogos de péptidos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos o peptídicos con propiedades análogas a las del péptido de plantilla. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber y Freidinger TINS p.392 (1985); y Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987).

Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelos moleculares computarizados. Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, $\gamma-\text{CH}_2\text{SO}-$, por métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden generarse por métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

"Anticuerpo" y "péptido(s) de anticuerpo" se refieren a un anticuerpo intacto o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto por una unión específica. Se producen fragmentos de unión mediante técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', $\text{F}(\text{ab}')_2$, Fv y anticuerpos de cadena única. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene idéntico cada uno de sus sitios de unión. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un receptor a un contrarreceptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido al contrarreceptor en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60% u 80%, y más normalmente en más de aproximadamente 85% (según se mide en un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente con una inmunoglobulina o un receptor de célula T. Los determinantes epitópicos consisten normalmente en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen normalmente unas características estructurales tridimensionales específicas así como unas características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente con un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, y muy preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$.

El término "agente" se utiliza aquí para significar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

Cómo se utilizan aquí, los términos "etiqueta" y "etiquetado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable mediante, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la fijación de grupos biotínico a un polipéptido que pueden ser detectados mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática, que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o el marcador puede ser también terapéutico. En la técnica se conocen, y se pueden utilizar, diversos métodos para marcación de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionucleidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I y ^{131}I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina y lantánido-fósforo), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa y fosfatasa alcalina), etiquetas quimioluminiscentes, grupos biotínico, y epítipos polipeptídicos predeterminados, reconocidos por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de uniones para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, y etiquetas epitópicas). En algunas realizaciones, las etiquetas se fijan mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir un posible impedimento estérico.

Como aquí se utiliza, la expresión "agente farmacéutico o fármaco" se refiere a un compuesto o composición química capaz de provocar un deseado efecto terapéutico cuando se administra apropiadamente a un paciente. Otros términos químicos presentes se usan de acuerdo con la utilización convencional en la técnica, como se ejemplifica en "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms" [redactado por S. Parker, McGraw-Hill, San Francisco (1985)].

La expresión "agente antineoplásico" se usa aquí para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir el desarrollo o progreso de una neoplasia en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa) tal como carcinoma, sarcoma, linfoma o leucemia. La inhibición de metástasis es frecuentemente una propiedad de los agentes antineoplásicos.

Como aquí se utiliza, "sustancialmente puro" significa una especie objetivo que es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar, es más abundante en la composición que cualquier otra especie individual), y, preferiblemente, una fracción sustancialmente purificada es una composición en que la especie objetivo comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, 90%, 95% y 99%. Muy preferiblemente, la especie objetivo se purifica hasta una homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales), en que la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

10 El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios.

Estructura de los anticuerpos

Se sabe que la unidad estructural básica de un anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, responsable principalmente del reconocimiento antigénico. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante, responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican en cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en mu, delta, gamma, alfa y épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo además las cadenas pesadas una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Véase, en general, *Fundamental Immunology*, Capítulo 7 [redactado por W. Paul, 2ª edición, Raven Press, New York, EE.UU. (1989)]

Las regiones variables de cada pareja de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo.

25 Por lo tanto, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales.

Todas las cadenas presentan la misma estructura general de regiones de armazón (FR; del inglés, framework regions) relativamente conservadas, unidas por tres regiones hipervariables también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada pareja están alineadas por las regiones de armazón, lo que permite la unión a un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, ambas cadenas, la ligera y la pesada, comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" [National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU. (1987 y 1991)], o Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), y Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

35 Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos parejas diferentes de cadenas pesada/ligera y dos diferentes sitios de unión. Se pueden producir anticuerpos biespecíficos mediante una diversidad de métodos, incluyendo la fusión de hibridomas y el enlace de fragmentos Fab'. Véanse, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990), y Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Además, se pueden formar anticuerpos biespecíficos como "diacuerpos" [Holliger et al., "Diabodies: Small bivalent and bispecific antibody fragments" *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993)] o "Janusins" [Traunecker et al., "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells", *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991), y Traunecker et al., "Janusin: New molecular design for bispecific reagents", *Int. J. Cancer, Supl.* 7:51-52 (1992)]. La producción de anticuerpos biespecíficos puede ser un proceso relativamente laborioso en comparación con la producción de anticuerpos convencionales, y los rendimientos y los grados de pureza son generalmente menores para los anticuerpos biespecíficos. No existen anticuerpos biespecíficos en forma de fragmentos que tengan un solo sitio de unión (por ejemplo, Fab, Fab' y Fv).

Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes murinas o de rata. La presencia de dichas proteínas de origen murino o de rata puede conducir al rápido aclaramiento de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo por el paciente. Con objeto de evitar la utilización de anticuerpos de origen murino o de rata, se ha postulado que se pueden desarrollar anticuerpos humanizados o generar anticuerpos totalmente humanos mediante la introducción de una función de anticuerpo humano en un roedor para que el roedor produzca anticuerpos que tengan una secuencia totalmente humana.

Anticuerpos humanos

55 La capacidad para clonar y reconstruir loci humanos con un tamaño de megabases en YACs y para introducirlos en la línea germinal de un ratón proporciona un planteamiento potente para elucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o toscamente mapeados así como para generar modelos útiles de enfermedades humanas.

Además, la utilización de dicha tecnología para la sustitución de loci de ratón por sus equivalentes humanos podría proporcionar perspectivas únicas en la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su implicación en la inducción y el progreso de enfermedades.

Una importante aplicación práctica de dicha estrategia es la "humanización" del sistema inmune humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en que se han inactivado los genes de Ig endógenos ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que subyacen bajo la expresión y el ensamblaje programados de anticuerpos así como su papel en el desarrollo de células B. Además, dicha estrategia podría proporcionar una fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales (mAbs) totalmente humanos, un hito importante hacia el cumplimiento de la promesa de la terapia con anticuerpos en enfermedades humanas. Se espera que los anticuerpos totalmente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a los mAbs de ratón o derivados de ratón y, por lo tanto, aumenten la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados. Se puede esperar que el uso de anticuerpos totalmente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones repetidas de anticuerpos.

Un planteamiento hacia esta finalidad fue diseñar razas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón, con grandes fragmentos de los loci de Ig humanos en previsión de que dichos ratones produjeran un gran repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humana preservarían la gran diversidad génica variable así como la apropiada regulación de la producción y expresión de anticuerpos. Explotando la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el reproducido repertorio de anticuerpos humanos en estas razas de ratón proporcionaría anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Utilizando la tecnología de hibridomas, se podrían producir y seleccionar fácilmente mAbs humanos antigénicamente específicos con la especificidad deseada.

Esta estrategia general fue demostrada en relación con nuestra generación de las primeras razas Xenomouse™, como se publicó en 1994. Véase Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994). Las razas Xenomouse™ fueron diseñadas con cromosomas artificiales de levadura (YACs; del inglés, yeast artificial chromosomes) que contenían fragmentos de configuración de la línea germinal, de 245 kb y 190 kb, del locus de la cadena pesada humana y el locus de la cadena ligera kappa, respectivamente, que contenían secuencias centrales de regiones variables y constantes (ídem). Se probó que los YACs que contenían Ig humana eran compatibles con el sistema del ratón tanto para el reordenamiento como para la expresión de anticuerpos y eran capaces de sustituir a los genes de Ig de ratón inactivados. Esto fue demostrado por su capacidad para provocar el desarrollo de células B, producir un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos y generar mAbs humanos antigénicamente específicos. Estos resultados también sugerían que la introducción de porciones más grandes de los loci de Ig humana que contuvieran números mayores de genes V, elementos reguladores adicionales y regiones constantes de Ig humana podría recapitular sustancialmente el repertorio completo que es característico de la respuesta humoral humana a la infección y la inmunización. El trabajo de Green et al. se extendió recientemente a la introducción de más de aproximadamente el 80% del repertorio de anticuerpos humanos por medio de la introducción de fragmentos de YAC de configuración de línea germinal, con un tamaño de megabases, de los loci de cadena pesada humana y los loci de cadena ligera kappa, respectivamente, para producir ratones Xenomouse™. Véanse Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), y la Solicitud de Patente de EE.UU. nº de serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996.

Dicho planteamiento es adicionalmente discutido y delineado en Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), y Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Véanse también la Patente Europea nº EP 0463151 B1, concesión publicada el 12 de Junio de 1996, Solicitud de Patente Internacional nº WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994, Solicitud de Patente Internacional nº WO 96/34096, publicada el 31 de Octubre de 1996, y WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998.

En un planteamiento alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un planteamiento de "minilocus". En el planteamiento de minilocus, se mimetiza un locus de Ig exógeno mediante la inclusión de trozos (genes individuales) del locus de Ig. De este modo, se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) en una construcción para inserción en un animal. Este planteamiento se describe en la Patente de EE.UU. número 5.545.807, concedida a Surani et al., las Patentes de EE.UU. números 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650 y 5.814.318, cada una concedida a Lonberg y Kay, la Patente de EE.UU. nº 5.591.669, concedida a Krimpenfort y Berns; las Patentes de EE.UU. nºs 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215, concedidas a Berns et al., la Patente de EE.UU. nº 5.643.763, concedida a Choi y Dunn, y las Solicitudes Internacionales de Patente de EE.UU., de 546 073 B1, números de serie WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884, cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Véanse además Taylor et al., 1992; Chert et al., 1993; Tuailon et al., 1993; Choi et al., 1993; Lonberg et al., (1994); Taylor et al., (1994); y Tuailon et al. (1995); Fishwild et al., (1996).

Una ventaja del planteamiento de minilocus es la rapidez con la que se pueden generar construcciones que incluyan

porciones del locus de Ig y se pueden introducir en animales. Sin embargo, proporcionalmente, una desventaja significativa del planteamiento de minilocus es que, en teoría, se introduce una diversidad insuficiente mediante la inclusión de pequeños números de genes V, D y J. En realidad, parece que el trabajo publicado apoya esta cuestión. El desarrollo de células B y la producción de anticuerpos por animales producidos mediante el uso del planteamiento de minilocus parecen poco desarrollados. Por lo tanto, la investigación que rodea el presente invento ha sido consistentemente dirigida hacia la introducción de grandes porciones del locus de Ig con objeto de alcanzar una mayor diversidad y en un esfuerzo para reconstituir el repertorio inmune de los animales.

Las respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA; del inglés, human anti-mouse antibodies) han conducido a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o, si no, humanizados. Aunque los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murina, se espera observar ciertas respuestas de anticuerpos humanos anti-quiméricos (HACA; del inglés, human anti-chimeric antibodies), particularmente en utilidades del anticuerpo crónicas o de dosis múltiples. Por lo tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos totalmente humanos contra CTLA-4 con objeto de invalidar los asuntos y/o efectos de la respuesta de HAMA o HACA.

Tecnologías de humanización y presentación

Como se discutió anteriormente en relación con la generación de anticuerpos humanos, hay ventajas a la hora de producir anticuerpos con inmunogenicidad reducida. Hasta cierto punto, esto se puede llevar a cabo en relación con técnicas de humanización y técnicas de presentación utilizando bancos apropiados. Se apreciará que, utilizando técnicas bien conocidas en este campo técnico, se pueden humanizar o primatizar anticuerpos murinos o anticuerpos de otras especies. Véanse, por ejemplo, Winter y Harris *Immunol. Today* 14:43-46 (1993), y Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). El anticuerpo de interés puede ser diseñado por técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios CH1, CH2, CH3 y bisagra, y/o el dominio de armazón, por la correspondiente secuencia humana (véanse el Documento WO 92/02190 y las Patentes de EE.UU. números 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 y 5.777.085). Además, en la técnica se conoce el uso de ADNc de Ig para la construcción de genes inmunoglobulínicos quiméricos [Liu et al., *P.N.A.S.* 84:3439 (1987), y J. *Immunol.* 139:3521 (1987)]. Se aísla ARNm de un hibridoma u otra célula que produzca el anticuerpo y se utiliza para producir ADNc. El ADNc de interés puede ser multiplicado mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos (Patentes de EE.UU. números 4.683.195 y 4.683.202). Alternativamente, se prepara un banco y se explora para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo es luego fusionada con secuencias de regiones constantes humanas. Las secuencias de genes de regiones constantes humanas pueden hallarse en Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Publicación nº 91-3242 del N.I.H. Los genes de regiones C humanas son fácilmente asequibles a partir de clones conocidos. La elección del isotipo vendrá guiada por las deseadas funciones efectoras, tal como la fijación del complemento, o la actividad en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los isotipos preferidos son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los isotipos particularmente preferidos para los anticuerpos de la invención son IgG2 e IgG4. Se puede utilizar cualquiera de las regiones constantes de cadenas ligeras humanas, kappa o lambda. Luego se expresa el anticuerpo humanizado quimérico mediante métodos convencionales.

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab, por escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante una escisión química o con proteasas. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codificara una porción del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguidas de un codón de terminación de la traducción para producir la molécula truncada.

En un planteamiento, se pueden usar secuencias de consenso que codifiquen las regiones J de cadenas pesadas y ligeras para diseñar oligonucleótidos para uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para el subsiguiente enlace de segmentos de la región V con segmentos de la región C humana. Se puede modificar el ADNc de la región C mediante mutagénesis dirigida al sitio, para situar un sitio de restricción en la posición análoga de la secuencia humana.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, YACs, episomas derivados del EBV, y similares. Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia inmunoglobulínica de CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados, diseñado para que cualquier secuencia de VH o VL pueda ser fácilmente insertada y expresada. En dichos vectores, se produce normalmente corte y empalme entre el sitio de corte y empalme del donante de la región J insertada, y el sitio de corte y empalme del aceptor que precede a la región C humana, y también en las regiones de corte y empalme que se encuentran en los exones de CH humanos. Se producen poliadenilación y terminación de transcripción en sitios cromosómicos nativos cadena abajo de las regiones de codificación. El anticuerpo quimérico resultante puede estar unido a cualquier potente promotor, incluyendo LTRs retrovirales, tales como, por ejemplo, el promotor precoz de SV-40 [Okayama et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:280 (1983)], la LTR del virus del sarcoma de Rous [Gorman et al., *P.N.A.S.* 79:6777 (1982)] y la LTR del virus de la leucemia murina de Moloney [Grosschedl et al., *Cell* 41:885 (1985)], promotores de Ig nativos, etc.

Además, se pueden generar anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies por medio de tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en este campo técnico, y las moléculas resultantes pueden ser

5 sometidas a una maduración adicional, tal como maduración de afinidad, y dichas técnicas son bien conocidas en este campo técnico: Wright y Harris, *supra*, Hanes y Plutchau, PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (presentación ribosómica); Parmley y Smith, Gene 73:305-318 (1988) (presentación en fagos); Scott, TIBS 17:241-245 (1992); Cwirla et al., PNAS USA 87:6378-6382 (1990); Rusell et al., Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993); Hoganboom et al., Immunol. Reviews 130:43-68 (1992); Chiswell y McCafferty, TIBTECH 10:80-84 (1992); y la Patente de EE.UU. n° 5.733.743. Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no sean humanos, dichos anticuerpos pueden ser humanizados del modo anteriormente descrito.

10 Utilizando estas técnicas, se pueden generar anticuerpos contra células que expresan CTLA-4, el propio CTLA-4, formas de CTLA-4, epítomos o péptidos del mismo, y bancos de expresión para el mismo (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 5.703.057) que pueden ser luego explorados, del modo anteriormente descrito, en cuanto a las actividades anteriormente descritas.

11 Criterios adicionales para compuestos terapéuticos de anticuerpo

15 Como se apreciará, generalmente no es deseable matar las células que expresan CTLA-4. En vez de ello, generalmente se desea simplemente inhibir la unión de CTLA-4 con sus ligandos para mitigar la infrarregulación de células T. Uno de los principales mecanismos a través de los cuales los anticuerpos matan células es a través de la fijación del complemento y la participación en CDC. La región constante de un anticuerpo desempeña un papel importante en relación con la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento y participar en CDC. De este modo, se selecciona generalmente el isotipo de un anticuerpo para proporcionar o no la capacidad de fijación del complemento. Generalmente, en el caso del presente invento, como se mencionó anteriormente, no se prefiere utilizar un anticuerpo que mata las células. Hay diversos isotipos de anticuerpos que son capaces de fijación del complemento y CDC, incluyendo, sin limitación, los siguientes: IgM murina, IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgM humana, IgG1 humana, e IgG3 humana; esos isotipos que no incluyen, sin limitación, IgG2 humana ni IgG4 humana.

25 Se apreciará que no es necesario que los anticuerpos que se generan posean inicialmente un isotipo deseado concreto, sino que, en vez de ello, el anticuerpo que se genera puede poseer cualquier isotipo y se puede cambiar más tarde el isotipo del anticuerpo usando técnicas convencionales que son bien conocidas en este campo técnico. Dichas técnicas incluyen, entre otras, el uso de técnicas recombinantes directas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 4.816.397) y técnicas de fusión de célula-célula (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 08/730.639, presentada el 11 de Octubre de 1996).

30 En la técnica de fusión de célula-célula, se prepara un mieloma u otra línea celular que posea una cadena pesada con cualquier isotipo deseado, y se prepara otro mieloma u otra línea celular que posea la cadena ligera. Más tarde, se pueden fusionar dichas células y se puede aislar una línea celular que exprese un anticuerpo intacto.

35 A modo de ejemplo, la mayoría de los anticuerpos contra CTLA-4 aquí discutidos son anticuerpos IgG2 humanos anti-CTLA-4. Puesto que dichos anticuerpos poseen la unión deseada con la molécula de CTLA-4, se puede cambiar fácilmente el isotipo de cualquiera de dichos anticuerpos para generar, por ejemplo, un isotipo IgG4 humano que aún posea la misma región variable (que define la especificidad del anticuerpo y parte de su afinidad).

En consecuencia, puesto que se generan candidatos a anticuerpo que satisfacen los deseados atributos "estructurales" anteriormente discutidos, mediante el cambio de isotipo se pueden proporcionar generalmente con al menos ciertos atributos "funcionales" adicionales que se desean.

40 Diseño y generación de otros compuestos terapéuticos

45 De acuerdo con la presente invención y basándose en la actividad de los anticuerpos que se producen y caracterizan en la presente memoria con respecto a CTLA-4, se facilita el diseño de otras modalidades terapéuticas que incluyen otros anticuerpos, otros antagonistas o restos químicos distintos de los anticuerpos. Tales modalidades incluyen, sin limitación, anticuerpos que tienen una actividad o funcionalidad de unión similar, terapias avanzadas de anticuerpos, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas y terapéuticas radiomarcadas, generación de terapias peptídicas, terapias genéticas, particularmente intracuerpos, terapias antisentido y moléculas pequeñas. Además, como se discutió anteriormente, la función efectora de los anticuerpos de la invención puede ser cambiada por paso del isotipo a IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos.

50 En relación con la generación de compuestos terapéuticos de anticuerpo avanzados en que la fijación del complemento es un atributo deseable, puede resultar posible evitar la dependencia del complemento para la muerte celular por medio del uso de, por ejemplo, compuestos biespecíficos, inmunotoxinas o radiomarcadores.

55 En relación con los anticuerpos biespecíficos, se pueden generar anticuerpos biespecíficos que comprendan (i) dos anticuerpos, uno con especificidad para CTLA-4 y otro para una segunda molécula, que se conjugan conjuntamente, (ii) un solo anticuerpo que tiene una cadena específica para CTLA-4 y una segunda cadena específica para una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de una sola cadena que tiene especificidad para CTLA-4 y para la otra molécula. Dichos anticuerpos biespecíficos pueden ser generados utilizando técnicas que son bien conocidas; por ejemplo, en relación con (i) y (ii), véanse, por ejemplo, Fanger et al., Immunol. Methods 4:72-81 (1994), y Wright y

Harris, *supra*, y, en relación con (iii), véase, por ejemplo, Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Supl.)* 7:51-52 (1992).

Además, también se pueden preparar "Kappacuerpos" [Ill et al., "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions", *Protein Eng.* 10:949-57 (1997)], "Minicuerpos" [Martin et al., "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6", *EMBO J.* 13:5303-9 (1994.)], "Diacuerpos" [Holliger et al., "Diabodies: Small bivalent and bispecific antibody fragments", *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993)], o "Janusins" [Traunecker et al., "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells", *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991), y Traunecker et al., "Janusin: New molecular design for bispecific reagents", *Int. J. Cancer, Supl.* 7:51-52 (1992)].

En relación con las inmunotoxinas, se pueden modificar anticuerpos para que actúen como inmunotoxinas utilizando técnicas que son bien conocidas en este campo técnico. Véase, por ejemplo, Vitetta, *Immunol. Today* 14:252 (1993). Véase también la Patente de EE.UU. nº 5.194.594. En relación con la preparación de anticuerpos radiomarcados, dichos anticuerpos modificados pueden ser también fácilmente preparados usando técnicas que son bien conocidas en este campo técnico. Véase, por ejemplo, Junghans et al. en "Cancer Chemotherapy and Biotherapy", 655-686 [2ª edición, redactado por Chafner y Longo, Lippincott Raven (1996)]. Véanse también las Patentes de EE.UU. nºs 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35.500), 5.648.471 y 5.697.902. Sería probable que cada una de las inmunotoxinas y las moléculas radiomarcadas matara células que expresan CTLA-4, y particularmente aquellas células en que los anticuerpos de la invención son eficaces.

En relación con la generación de péptidos terapéuticos, a través de la utilización de información estructural relacionada con CTLA-4 y sus anticuerpos, como los anticuerpos de la invención (como se analiza más adelante en relación con moléculas pequeñas) o la selección de bibliotecas de péptidos, péptidos terapéuticos que pueden ser generados los dirigidos contra CTLA-4. El diseño y la selección de la terapéutica de péptidos se discute en relación con Houghten et al. *Biotechniques* 13:412-421 (1992), Houghten *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985), Pinalla et al. *Biotechniques* 13:901-905 (1992), Blake y Litz-Davis *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992). Las inmunotoxinas y las moléculas radiomarcadas también pueden prepararse, y de una manera similar, en relación con restos peptídicos como se discutió anteriormente en relación con anticuerpos.

La información importante relacionada con la unión de un anticuerpo a un antígeno se puede obtener a través de la experimentación con la presentación de fagos. Dichos experimentos generalmente se llevan a cabo mediante la selección de una biblioteca de fagos que expresa péptidos aleatorios para unirse a los anticuerpos de la invención para determinar si se pueden aislar péptidos que se unen. Si tiene éxito, cierta información del epítipo puede ser obtenida por los péptidos que se unen.

En general, las bibliotecas de fagos que expresan péptidos aleatorios se pueden comprar en New England Biolabs (bibliotecas 7-mer y 12-mer, Ph.D.-7 Peptide 7-mer Library Kit y Ph.D.-12 Peptide 12-mer Library Kit, respectivamente) basado en un bacteriófago M13. La biblioteca de 7 mer representa una diversidad de aproximadamente 2.0×10^9 clones independientes, que representa la mayoría, si no todos, de las posibles secuencias de 7 mer de $20^7 = 1,28 \times 10^9$. La biblioteca de 12 mer contiene aproximadamente $1,9 \times 10^9$ clones independientes y representa solo una muestra muy pequeña del espacio de secuencia potencial de $20^{12} = 4,1 \times 10^{15}$ secuencias de 12 mer. Cada una de las bibliotecas 7-mer y 12-mer se panoramizan o seleccionan de acuerdo con las recomendaciones del fabricante en las que las placas se recubrieron con un anticuerpo para capturar el anticuerpo apropiado (un FG de cabra anti-humano de IgG para un anticuerpo de IgG, por ejemplo) seguido de lavado. Los fagos unidos se eluyen con glicina HCl 0,2 M, pH 2,2. Después de 3 rondas de selección/amplificación con rigurosidad constante (Tween al 0,5%), mediante el uso de la secuenciación de ADN, se pueden caracterizar los clones de las bibliotecas que son reactivas con uno o más de los anticuerpos. La reactividad de los péptidos se puede determinar por ELISA. Para una discusión adicional sobre el análisis de epítipos de péptidos, véase también Scott, J.K. y Smith, G.P. *Science* 249:386-390 (1990); Cwirla et al. *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990); Felici et al. *J. Mol. Biol.* 222:301-310 (1991), y Kuwabara et al. *Nature Biotechnology* 15:74-78 (1997).

El diseño de terapias genéticas y/o antisentido a través de técnicas convencionales también se facilita a través de la presente invención. Tales modalidades se pueden utilizar para modular la función de CTLA-4. En relación con esto, los anticuerpos de la presente invención facilitan el diseño y uso de ensayos funcionales relacionados con los mismos. Un diseño y una estrategia para terapias antisentido se discuten en detalle en la Solicitud de Patente Internacional nº. WO 94/29444. El diseño y las estrategias para la terapia génica son bien conocidos. Sin embargo, en particular, el uso de técnicas terapéuticas de genes que implican intracuerpos podría resultar particularmente ventajoso. Véase, por ejemplo, Chen et al. *Human Gene Therapy* 5:595-601 (1994) y Marasco *Gene Therapy* 4:11-15 (1997). El diseño general y las consideraciones relacionadas con la terapia génica también se analizan en la solicitud de patente internacional nº WO 97/38137. Los materiales genéticos que codifican un anticuerpo de la invención (como el 4.1.1, 4.8.1 o 6.1.1 u otros) pueden incluirse en un sistema de expresión adecuado (ya sea viral, atenuado viral, no viral, desnudo o de lo contrario) y administrado a un huésped para la generación in vivo del anticuerpo en el huésped.

De acuerdo con la presente invención, también se pueden contemplar terapias de moléculas pequeñas. Los fármacos pueden diseñarse para modular la actividad de CTLA-4 basándose en la presente invención. El conocimiento obtenido de la estructura de la molécula CTLA-4 y sus interacciones con otras moléculas de acuerdo

con la presente invención, tales como los anticuerpos de la invención, CD28, B7, B7-1, B7-2, y otros pueden utilizarse para diseñar racionalmente modalidades terapéuticas adicionales. En este sentido, se pueden utilizar técnicas de diseño racional de fármacos como la cristalografía de rayos X, el modelado molecular asistido por computadora (o asistida) (CAMM), la relación de estructura-actividad cuantitativa o cualitativa (QSAR) y tecnologías similares para enfocar los esfuerzos de descubrimiento de fármacos. El diseño racional permite la predicción de proteínas o estructuras sintéticas que pueden interactuar con la molécula o formas específicas de la misma que se pueden usar para modificar o modular la actividad de CTLA-4. Dichas estructuras pueden sintetizarse químicamente o expresarse en sistemas biológicos. Este enfoque ha sido revisado en Capsey et al. *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)). En efecto, el diseño racional de moléculas (péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas o similares) basado en relaciones de estructura-actividad conocidas o delineadas con otras moléculas (como los anticuerpos de acuerdo con la invención) se ha vuelto generalmente rutinario. Véase, por ejemplo, Fry et al. "Inactivación específica e irreversible del receptor del factor de crecimiento epidérmico y erbB2 por una nueva clase de inhibidores de la tirosina quinasa" *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12022-7 (1998); Hoffman et al. "Un modelo de dominio catalítico de fosfatasa Cdc25 y superficie de interacción Cdk basado en la presencia de un dominio de homología de rodán" *J Mol Biol* 282:195-208 (1998); Ginalski et al. "Modelización de formas activas de proteína quinasas:p38 - un estudio de caso" *Acta Biochim Pol* 44:557-64 (1997); Jouko et al. "Identificación de los sitios de fosforilación de tirosina csk y un residuo de tirosina importante para la estructura del dominio de la quinasa" *Biochem J* 322:927-35 (1997); Singh et al. "Diseño basado en la estructura de un inhibidor potente, selectivo e irreversible del dominio catalítico de la subfamilia de proteínas tirosina quinasas receptor erbB" *J Med Chem* 40:1130-5 (1997); Mandel et al. "ABGEN:un enfoque automatizado basado en el conocimiento para el modelado de estructuras de anticuerpos" *Nat Biotechnol* 14:323-8 (1996); Monfardini et al. "Diseño racional, análisis y utilidad potencial de los antagonistas de GM-CSF" *Proc Assoc Am Physicians* 108:420-31 (1996); Furet et al. "Estudio de modelización de los inhibidores de la proteína quinasa:modo de unión de estaurosporina y origen de la selectividad de CGP 52411" *J Comput Aided Mol Des* 9:465-72 (1995).

Además, las bibliotecas combinatorias pueden diseñarse y sintetizarse y usarse en programas de detección, como los esfuerzos de detección de alto rendimiento.

Administración terapéutica y formulaciones

Se apreciará que la administración de elementos terapéuticos de acuerdo con la invención se llevará a cabo con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar una transferencia, una distribución y una tolerancia mejoradas, y similares. En el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: "Remington's Pharmaceutical Sciences" [15ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, EE.UU. (1975)], particularmente en su Capítulo 87 de Blaug y Seymour, se pueden hallar múltiples formulaciones apropiadas. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, bálsamos, ceras, aceites, lípidos, vesículas (tales como Lipofectin™) que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos), productos de conjugación de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Cualquiera de las mezclas precedentes puede ser apropiada en los tratamientos y terapias de acuerdo con el presente invento con tal de que el ingrediente activo de la formulación no resulte inactivado por la formulación y que la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Para una información adicional relativa a excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos, véase también Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations", *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52:238-311 (1998) y las citas del mismo.

Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos de acuerdo con la invención son preferiblemente preparados mediante la utilización de un ratón transgénico que tiene insertada una porción sustancial del genoma productor de anticuerpos humano pero que se ha hecho deficiente en la producción de anticuerpos murinos endógenos. Entonces, dichos ratones son capaces de producir anticuerpos y moléculas inmunoglobulínicas humanas y son deficientes en la producción de anticuerpos y moléculas inmunoglobulínicas murinas. En las patentes, solicitudes y referencias descritas en la presente sección "Fundamento" se describen las tecnologías utilizadas para alcanzar lo anterior. Sin embargo, en particular, en la Solicitud de Patente de EE.UU. nº de serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996, cuya descripción se incorpora aquí por referencia, se describe una realización preferida para la producción transgénica de ratones y anticuerpos de los mismos. Véase también Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).

Mediante el uso de dicha tecnología, hemos producido anticuerpos monoclonales totalmente humanos hacia una diversidad de antígenos. Esencialmente, inmunizamos líneas XenoMouse™ de ratones con un antígeno de interés, recuperamos células linfáticas (tales como células B) de los ratones que expresan anticuerpos y fusionamos dichas células recuperadas con una línea celular de tipo mielóide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y dichas líneas celulares de hibridoma son exploradas y seleccionadas para identificar las líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. Utilizamos estas técnicas de acuerdo con el presente invento para la preparación de anticuerpos específicos para CTLA-4. Describimos aquí la producción de múltiples líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para CTLA-4. Además, proporcionamos una caracterización de los anticuerpos producidos por dichas líneas celulares, incluyendo análisis

de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de dichos anticuerpos.

Los anticuerpos derivados de líneas celulares de hibridoma aquí discutidas son denominados 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1. Cada uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares anteriormente mencionadas son cadenas pesadas de IgG2 o IgG4 totalmente humanas con cadenas ligeras kappa humanas. En general, los anticuerpos de acuerdo con la invención poseen unas afinidades muy elevadas, poseyendo típicamente unas Kd de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-11} , cuando se mide por fase sólida o fase de disolución.

Como se apreciará, los anticuerpos de acuerdo con el presente invento pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican los ADNc o clones genómicos para los anticuerpos concretos pueden ser utilizadas para la transformación de una adecuada célula huésped de mamífero o de no mamífero. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector vírico) y transducir una célula huésped con el virus (o el vector), o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica en las Patente de EE.UU. n^{os} 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. El procedimiento de transformación utilizado depende del huésped que se va a transformar. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por Polybrene, fusión de protoplastos, electroporación, bombardeo con partículas, encapsulación del(de los) polinucleótido(s) en liposomas, productos de conjugación peptídicos, dendrímeros, y microinyección directa del ADN en núcleos.

Las líneas celulares de mamífero asequibles como huéspedes para expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas asequibles del American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO; del inglés, chinese hamster ovary), células NSO₀, HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK; del inglés, baby hamster kidney), células renales de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y otras numerosas líneas celulares. Para expresar anticuerpos recombinantes, también se pueden usar células que no sean de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, células bacterianas, de levadura, de insecto y de plantas. Se puede preferir la mutagénesis del dominio CH2 del anticuerpo, dirigida al sitio, para eliminar la glicosilación con objeto de evitar cambios en las funciones inmunogénicas, farmacocinéticas y/o efectoras que resultan de una glicosilación no humana. Los métodos de expresión se seleccionan determinando qué sistema genera los mayores niveles de expresión y produce anticuerpos con propiedades de uniones de CTLA-4 constitutivas.

Además, la expresión de anticuerpos de la invención (u otros grupos de los mismos) a partir de líneas celulares de producción puede ser potenciada utilizando diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, los sistemas de expresión de los genes de glutamina sintetasa y DHFR son planteamientos comunes para potenciar la expresión bajo ciertas condiciones. Se pueden identificar clones celulares de alta expresión utilizando técnicas convencionales, tales como clonación por dilución limitada y tecnología Microdrop. El sistema GS se discute, en todo o en parte, en relación con las Patentes Europeas números 0216846, 0256055 y 0323997 y la Solicitud de Patente Europea número 89303964.4.

Los anticuerpos de la invención pueden ser también producidos transgénicamente mediante la generación de un mamífero o vegetal que sea transgénico en cuanto a las secuencias de cadenas pesadas y ligeras inmunoglobulínicas de interés y la producción del anticuerpo en forma recuperable a partir de él. En relación con la producción transgénica en mamíferos, se pueden producir anticuerpos en, y recuperar de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957.

Los anticuerpos de acuerdo con el presente invento han sido analizados estructural y funcionalmente. En relación con las estructuras de los anticuerpos, se han pronosticado las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras kappa basándose en la secuencia de ADNc obtenida por medio de una RT-PCR de los hibridomas. Véanse los Ejemplos 3 y 4 y las Figuras 1-8. Se llevó también a cabo la secuenciación N-terminal de los anticuerpos para confirmación de los resultados discutidos en los Ejemplos 3 y 4. Véanse el Ejemplo 5 y la Figura 9. Se llevaron a cabo análisis cinéticos de los anticuerpos para determinar afinidades. Véase el ejemplo2. Anticuerpos de acuerdo con la invención (y particularmente los anticuerpos de la invención 4.1.1, 4.8.1, y 6.1.1) tienen altas afinidades ($4.1.1:1.63 \times 10^{10}$ 1/M; $4.8.1:3.54 \times 10^{10}$ 1/M; y $6.1.1:7.2 \times 10^9$ 1/M).. Además, se analizaron los anticuerpos por enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis en gel reductor (SDS-PAGE), cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en fase líquida/espectroscopia de masas y espectroscopia de masas, y se evaluó la producción de anticuerpos por los hibridomas. Véanse el Ejemplo 6 y la Figura 10.

En relación con el análisis funcional de los anticuerpos de acuerdo con el presente invento, se probó que dichos anticuerpos son potentes inhibidores de CTLA-4 y de su unión con sus ligandos de la familia B7 de moléculas. Por ejemplo, se demostró que anticuerpos de acuerdo con el presente invento bloqueaban la unión de CTLA-4 con B7-1 o B7-2. Véase el Ejemplo 7. En realidad, muchos de los anticuerpos de acuerdo con la invención poseen unas IC₅₀ nanomolares y subnanomolares con respecto a la inhibición de la unión de CTLA-4 a B7-1 y B7-2. Además, los

5 anticuerpos de la invención poseen una excelente selectividad para CTLA-4 en comparación con CD28, CD44, B7-2 o hlgG1. Véase el Ejemplo 8. La selectividad es una relación que refleja el grado de unión preferente de una molécula con un primer agente en comparación con la unión de la molécula con un segundo agente y, opcionalmente, otras moléculas. Aquí, la selectividad se refiere al grado de unión preferente de un anticuerpo de la invención con CTLA-4 en comparación con la unión del anticuerpo con otras moléculas tales como CD28, CD44, B7-2 y hlgG1. Son comunes los valores de selectividad superiores a 500:1 en los anticuerpos de la invención. También se ha demostrado que los anticuerpos de la invención provocan o potencian la expresión de ciertas citocinas (tales como IL-2 e IFN- γ) por células T cultivadas, en un modelo de blastos de células T. Véanse los Ejemplos 9 y 10 y las Figuras 12-17. Además, se espera que los anticuerpos de la invención inhiban el crecimiento de tumores en modelos tumorales *in vivo* apropiados. El diseño de dichos modelos se discute en los Ejemplos 11 y 12.

10 Los resultados demostrados de acuerdo con el presente invento indican que anticuerpos del presente invento poseen ciertas calidades que les pueden hacer más eficaces que los actuales anticuerpos terapéuticos contra CTLA-4.

15 En particular, los anticuerpos de la invención 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1 poseen propiedades muy deseables. Sus características estructurales, funciones o actividades proporcionan criterios que facilitan el diseño o la selección de anticuerpos adicionales u otras moléculas como las anteriormente discutidas. Dichos criterios incluyen uno o más de los siguientes:

capacidad para competir con uno o más de los anticuerpos de la invención por unirse a CTLA-4;
 especificidad de unión para CTLA-4 similar a la de uno o más de los anticuerpos de la invención;
 20 una afinidad de unión por CTLA-4 de aproximadamente 10^{-9} M o superior, y preferiblemente de aproximadamente 10^{-10} M o superior;

no reacciona cruzadamente con un CTLA-4 de mamífero inferior, incluyendo preferiblemente CTLA-4 de ratón, rata o conejo, y preferiblemente CTLA-4 de ratón o rata;

reacciona cruzadamente con CTLA-4 de primate, incluyendo preferiblemente CTLA-4 de cinomolgos y rhesus;

25 una selectividad para CTLA-4 con respecto a CD28, B7-2, CD44 o hlgG1 de al menos aproximadamente 100:1 o superior, y preferiblemente de aproximadamente 300, 400 ó 500:1 o superior;

una IC₅₀ en cuanto a bloquear la unión de CTLA-4 con B7-2 de aproximadamente 100 nM o inferior, y preferiblemente de 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 ó 0,38 nM o inferior;

30 una IC₅₀ en cuanto a bloquear la unión de CTLA-4 con B7-1 de aproximadamente 100 nM o inferior, y preferiblemente de 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 ó 0,50 nM o inferior;

Una potenciación de la producción de citocinas en uno o más ensayos *in vitro*, por ejemplo:

una potenciación de la producción de IL-2 en un ensayo con blastos de células T/Raji, de aproximadamente 500 pg/ml o superior y preferiblemente de 750, 1000, 1500, 2000, 3000 ó 3846 pg/ml o superior;

35 una potenciación de la producción de IFN- γ en un ensayo con blastos de células T/Raji, de aproximadamente 500 pg/ml o superior y preferiblemente de 750, 1000 ó 1233 pg/ml o superior; o

una potenciación de la producción de IL-2 en un ensayo con hPBMC o con sangre completa y superantígeno, de aproximadamente 500 pg/ml o superior y preferiblemente de 750, 1000, 1200 ó 1511 pg/ml o superior. Expresado de otro modo, es deseable que, en el ensayo, la producción de IL-2 resulte potenciada en aproximadamente un 30, 35, 40, 45, 50 o más por ciento con respecto al testigo.

40 Se espera que los anticuerpos (o las moléculas diseñadas o sintetizadas a partir de ellos) que tienen una o más de estas propiedades posean una eficacia similar a la de los anticuerpos descritos en el presente invento.

45 Las deseables propiedades funcionales anteriormente discutidas pueden resultar a menudo de la unión a, y la inhibición de, CTLA4 por una molécula (es decir, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o pequeña molécula) de una manera similar a la de un anticuerpo de la invención (es decir, la unión a un epítipo igual o similar de la molécula de CTLA4).

La molécula puede ser administrada directamente (es decir, administración directa de dichas moléculas a un paciente) o, alternativamente, la molécula puede ser "administrada" indirectamente [es decir, un péptido o similar que produce una respuesta inmune en un paciente (similar a una vacuna), en que la respuesta inmune incluye la generación de anticuerpos que se unen a un epítipo igual o similar, o un anticuerpo o fragmento que se produce *in situ* después de la administración de materiales genéticos que codifican dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a un epítipo igual o similar. De este modo, se apreciará que el epítipo de CTLA4 al que se unen los anticuerpos de la invención puede ser útil en relación con la preparación y/o el diseño de productos

5 terapéuticos de acuerdo con la invención. En el diseño de fármacos, también es a menudo útil la información negativa (es decir, resulta útil el hecho de que un anticuerpo que se une a CTLA4 no parezca unirse a un epítipo que actúa como un inhibidor de CTLA4). De esta forma, el epítipo al que se unen anticuerpos de la invención que no conducen a la funcionalidad deseada puede ser también muy útil. En consecuencia, de acuerdo con la presente descripción también se contemplan moléculas (y particularmente anticuerpos) que se unen a un epítipo igual o similar al que se unen anticuerpos de la invención.

Además del hecho de que, de acuerdo con la descripción, se contemplan anticuerpos de la descripción y los epítipos a los que se unen, hemos realizado ciertos estudios preliminares sobre mapeo epitópico de ciertos anticuerpos de acuerdo con la descripción y particularmente de los anticuerpos 4.1.1 y 11.2.1 de la descripción.

10 Como primera operación, llevamos a cabo estudios de competición BIAcore para generar un mapa basto de unión entre ciertos anticuerpos de la invención en relación con su capacidad para competir por unirse a CTLA4. Con este fin, se unió CTLA4 a un chip BIAcore y se unió a él un primer anticuerpo bajo condiciones saturantes, y se midió la competición de subsiguientes anticuerpos secundarios que se unen a CTLA4. Esta técnica permitía la generación de un basto mapa en el que pueden clasificarse familias de anticuerpos.

15 A lo largo de este proceso, determinamos que los ciertos anticuerpos de acuerdo con la invención podían ser clasificados en las siguientes categorías epitópicas:

Categoría	Anticuerpos	Competición por unirse a CTLA4
A	BO1M*	Libre competencia cruzada entre sí; competencia cruzada con la categoría B; cierta competencia cruzada con la categoría D
	BO2M**	
B	4.1.1	Libre competencia cruzada entre sí; competencia cruzada con las categorías A, C y D
	4.13.1	
C	6.1.1	Libre competencia cruzada entre sí; competencia cruzada con la categoría B y la categoría D
	3.1.1	
	4.8.1	
	11.2.1	
	11.6.1	
	11.7.1	
D	4.14.3	Competencia cruzada con las categorías C y B; cierta competencia cruzada con la categoría A
E	4.9.1	BNI3 bloquea la unión de 4.9.1 a CTLA-4, pero no a la inversa
	BNI3***	
(*) (**) Asequibles de Biostride (***) Asequible de Pharmingen		

20 Como siguiente operación, procuramos determinar si los anticuerpos reconocían un epítipo lineal de CTLA4 bajo condiciones reductoras y no reductoras en transferencias Western. Observamos que parecía que ninguno de los anticuerpos de la invención 4.1.1, 3.1.1, 11.7.1, 11.6.1 y 11.2.1 reconocía una forma reducida de CTLA4 en las transferencias Western. En consecuencia, parecía probable que el epítipo al que se unía cada uno de estos anticuerpos no era un epítipo lineal sino, más probablemente, un epítipo conformacional cuya estructura podía haber sido invalidada bajo las condiciones reductoras.

25 Por lo tanto, buscamos determinar si podíamos aprender acerca de los restos de la molécula de CTLA-4 que eran importantes para la unión de los anticuerpos de la invención. Una manera que utilizamos fue llevar a cabo evaluaciones cinéticas de las velocidades de disociación entre CTLA4 humano y dos moléculas de CTLA4 de primate muy conservadas (CTLA4 de cinomolgos y títi). Estudios BIAcore demostraron que el anticuerpo 4.1.1 de la invención se unía a CTLA4 de ser humano, cinomolgos y títi a la misma velocidad. Sin embargo, con respecto a las velocidades de disociación (afinidad), el anticuerpo 4.1.1 tenía la mayor afinidad (velocidad de disociación más lenta)

30 para el ser humano, una velocidad de disociación más rápida para el cinomolgos y una velocidad de disociación

mucho más rápida para el tití. Por otra parte, el anticuerpo 11.2.1 de la invención se une a CTLA4 de ser humano, cinomolgos y tití a aproximadamente la misma velocidad y tiene aproximadamente la misma velocidad relativa de disociación para cada uno de los tres. Esta información indica además que los anticuerpos 4.1.1 y 11.2.1 de la invención se unen a diferentes epítomos de CTLA4.

5 Para estudiar adicionalmente el epítomo al que se unen los anticuerpos de las categorías B y C de la invención, llevamos a cabo ciertos estudios de mutagénesis dirigida al sitio. El CTLA4 de tití posee dos importantes cambios en los restos 105 y 106 con respecto al CTLA4 humano. Dichas diferencias son un cambio de leucina a metionina en el resto 105 y un cambio de glicocola a serina en el resto 106. En consecuencia, mutamos el ADNc que codifica CTLA4 humano para que codificara un CTLA4 mutado que tuviera los cambios L105M y G106S. El CTLA4 mutante por sustitución homóloga no efectuaba la unión de una proteína de fusión B7-2-IgG1. Además, no se efectuó la unión con el anticuerpo 11.2.1 de la invención. Sin embargo, dicha molécula estaba significativamente inhibida en su capacidad para unirse con el anticuerpo 4.1.1 (similamente a la de tití). A continuación, mutamos un ADNc que codificaba CTLA4 de tití para crear un CTLA4 mutante de tití que tuviera un cambio S106G. Dicho cambio daba lugar al restablecimiento de la unión estable entre el anticuerpo 4.1.1 y el CTLA-4 mutante de tití. Además, mutamos un ADNc que codificaba CTLA-4 de tití para crear un CTLA-4 mutante de tití que tuviera un cambio M105L. Dicho cambio restablecía parcialmente la unión entre el anticuerpo 4.1.1 y el CTLA-4 mutante.

20 Parece que cada uno de los anticuerpos de las categorías B a D de la invención posee similares propiedades funcionales y tiene el potencial para actuar como un potente agente terapéutico anti-CTLA4. Además, cada una de las moléculas presenta cierta competencia cruzada en su unión con CTLA4. Sin embargo, como se observará de la discusión anterior, parece que cada una de las moléculas de las diferentes categorías se une a diferentes epítomos conformacionales de CTLA4.

25 A partir de lo precedente, se apreciará que la información epitópica anteriormente discutida indica que los anticuerpos (u otras moléculas, como se discutió anteriormente) que compiten cruzadamente con anticuerpos de la invención tendrán probablemente cierto potencial terapéutico de acuerdo con el presente invento. Además, se espera que los anticuerpos (u otras moléculas, como se discutió anteriormente) que compiten cruzadamente con anticuerpos de la invención (es decir, compiten cruzadamente con anticuerpos de las categorías B, C y/o D) tendrán probablemente cierto potencial terapéutico adicional de acuerdo con el presente invento. Además, se espera que los anticuerpos (u otras moléculas, como se discutió anteriormente) que compiten cruzadamente con anticuerpos de la invención (es decir, compiten cruzadamente con anticuerpos de las categorías B, C y/o D) y que (i) no tienen reducida su unión con CTLA4 de tití (similamente al anticuerpo 11.2.1) o (ii) tienen reducida su unión con CTLA4 de tití (similamente al anticuerpo 4.1.1) tendrán probablemente cierto potencial terapéutico adicional de acuerdo con el presente invento. Los anticuerpos (u otras moléculas, como se discutió anteriormente) que compiten con las categorías A y E pueden tener también cierto potencial terapéutico.

Ejemplos

35 Los ejemplos siguientes, que incluyen los experimentos llevados a cabo y los resultados alcanzados, se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no deben ser considerados restrictivos del presente invento.

Ejemplo 1

Generación de hibridomas que producen anticuerpos anti-CTLA-4

Se prepararon, seleccionaron y analizaron anticuerpos de la invención de acuerdo con el presente Ejemplo.

40 Preparación de antígenos: Se prepararon tres inmunógenos distintos para la inmunización de los ratones XenoMouse™: (i) una proteína de fusión CTLA-4-IgG, (ii) un péptido de CTLA-4 y (iii) células de linfoma murino 300.19 transfectadas con un mutante de CTLA-4 (Y201 V) que se expresa constitutivamente en la superficie celular.

(i) Proteína de fusión CTLA-4-IgG1

Construcción del vector de expresión

45 El ADNc que codifica los dominios extracelulares maduros de CTLA-4 fue multiplicado por PCR a partir de un banco de ADNc de timo humano (Clontech) usando cebadores diseñados para la secuencia publicada [Eur. J. Immunol. 18:1901-1905 (1988)]. El fragmento fue direccionalmente subclonado en pSR5, un plásmido de expresión del virus Sindbis (InVitrogen), entre el péptido señal de la oncostatina M humana y los dominios CH₁/CH₂/CH₃ de IgG gamma 1 (IgG1) humana. La proteína de fusión no contiene un dominio bisagra pero contiene una cisteína 120 en el dominio extracelular de CTLA-4 para formar un dímero covalente. El vector resultante fue denominado CTLA-4-IgG1/pSR5. La secuencia del ADNc de CTLA-4-IgG1 completo en el vector fue confirmada en ambas cadenas. Más adelante se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína CTLA-4-Ig. El dominio extracelular maduro para CD44 fue multiplicado por PCR a partir de un banco de linfocitos humanos (Clontech) y fue subclonado en pSinRep5 para generar una proteína testigo con la cola de IgG1 idéntica.

55

Proteína de fusión OM-CTLA4-IgG1:

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVC
EYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICT
GTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPIYLGIGNGTQIY
VIDPEPCPDSLEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPTPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Subrayado:péptido señal

Negrita:dominio extracelular de CTLA-4

5 Los ADNc para el dominio extracelular maduro de CD28 fueron multiplicados por PCR a partir de un banco de linfocitos humanos (Clontech) y fueron luego subclonados en pCDM8 [J. Immunol. 151:5261-71 (1993)] para producir una proteína de fusión de IgG1 humana que contenía regiones tanto bisagra como de escisión por trombina. Se clonaron CTLA4 de tití, cinomologos y rhesus a partir de ARNm aislado de PBMCs estimuladas con PHA, usando técnicas estándares de PCR degenerada. La secuenciación demostró que las secuencias de aminoácidos de rhesus y cinomolgos eran idénticas con tres diferencias con respecto a dominio extracelular maduro de CTLA4 humano (S13N, I17T y L105M). El CTLA4 de tití presentaba 10 diferencias de aminoácidos con respecto al dominio extracelular maduro de CTLA4 humano (V21A, V33I, A41T, A51G, 54I, S71F, Q75K, T88M, L105M y G106S). Se utilizó una mutagénesis dirigida al sitio para crear mutaciones puntuales únicas de todos los aminoácidos diferentes en el CTLA4 de tití, para mapear los aminoácidos importantes para la interacción de los anticuerpos con IgG-CTLA4 humano. Mediante la mutagénesis dirigida al sitio Matchmaker (Promega) se generaron mutaciones de IgG-CTLA4 humano y de tití para el mapeo epitópico. Se produjeron las proteínas de fusión de IgG mediante la transfección transitoria de células COS7 y se purificaron utilizando técnicas estándares con proteína A. Las proteínas CTLA4-IgG mutantes fueron evaluadas en cuanto a la unión a anticuerpos mediante inmunotransferencia y utilizando análisis BIAcore.

20 Expresión/purificación de proteínas recombinantes

Se generó un virus Sindbis recombinante al someter células renales de cría de hámster a electroporación (Gibco) con SP6 *in vitro*, ARNm de CTLA-4-IgG/pSR5 transcrito y ARNm auxiliar de DH-26S, del modo descrito por InVitrogen. Cuarenta y ocho horas más tarde, se recolectó el virus recombinante y se tituló en células ováricas de hámster chino (CHO-K1) en cuanto a una óptima expresión proteica. Se cultivaron células CHO-K1 en suspensión en DMLM/F12 (Gibco) que contenía suero bovino fetal (FBS; del inglés, fetal bovine serum; Gibco) al 10%, térmicamente inactivado, aminoácidos no esenciales (Gibco), glutamina 4 mM (Gibco), penicilina/estreptomina (Gibco) y HEPES 10 mM, pH de 7,5 (Gibco). Para producir CTLA-4-IgG, las células CHO-K1 fueron resuspendidas en DMEM/F12 en una concentración de 1×10^7 células/ml y fueron incubadas con el virus Sindbis durante una hora a temperatura ambiental. Las células fueron luego diluidas hasta una concentración de 1×10^6 /ml en DMEM/F12 que contenía suero bovino fetal al 1% desprovisto de IgG bovina tras usar proteína A-Sepharose (Pharmacia), aminoácidos no esenciales, glutamina 4 mM, HEPES 12,5 mM, pH de 7,5, y penicilina/estreptomina. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se separaron las células como sedimento de centrifugación, se recogió el medio acondicionado y se complementó con tabletas de inhibidores completos de proteasas (Boehringer Mannheim), se ajustó el pH a 7,5 y se filtró el medio a través de filtros de 0,2 μ m (Nalgene). Se utilizó una cromatografía rápida de proteínas en fase líquida (Pharmacia) para purificar la proteína de fusión por afinidad, utilizando una columna HiTrap de proteína A de 5 ml de capacidad (Pharmacia) y un caudal de 10 ml/min. La columna fue lavada con 30 volúmenes de lecho de PBS y fue sometida a elución con glicocola 0,1 M/HCl, pH de 2,8, y un caudal de 1 ml/min. El pH de las fracciones (1 ml) fue inmediatamente neutralizado a 7,5 con Tris, pH de 9. Las fracciones que contenían CTLA-4-IgG1 fueron identificadas mediante SDS-PAGE y fueron luego concentradas utilizando Centriplus 50 (Amicon) antes de ser aplicadas a una columna de Sepharose 200 (Pharmacia) utilizando PBS como disolvente y un caudal de 1 ml/min. Las fracciones que contenían CTLA-4-IgG1 fueron reunidas, esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0,2 μ m (Millipore), divididas en partes alícuotas y congeladas a -80 °C. Se expresó y purificó CD44-IgG1 usando los mismos métodos. Se purificó CD28-IgG a partir de medios acondicionados procedentes de células COS7 transitoriamente transfectadas.

45 Caracterización de CTLA-4-IgG1

El CTLA-4-IgG1 purificado migraba como una sola banda en SDS-PAGE utilizando una tinción con Coomassie coloidal (Novex). Bajo condiciones no reductoras, CTLA-4-IgG1 era un dímero (100 kDa), que se reducía a un

monómero de 50 kDa cuando era tratado con DTT 50 mM. La secuenciación de aminoácidos en disolución del CTLA-4-IgG1 purificado confirmó el extremo N de CTLA-4 (MHVAQPAVVLAS) y que el péptido señal de la oncostatina M era escindido de la proteína de fusión madura.

- 5 El CTLA-4-IgG1 se unía a B7-1-IgG inmovilizado, de un modo dependiente de la concentración, y la unión era bloqueada por un anticuerpo de hámster anti-CTLA-4 humano (BNI3; Pharmingen). El CTLA-4-IgG estéril estaba exento de endotoxinas y fue cuantificado por densidad óptica a 280 nm usando 1,4 como coeficiente de extinción. La producción de CTLA-4-IgG purificado variaba entre 0,5 y 3 mg/litro de células CHO-K1.

(ii) Péptido de CTLA-4

Se preparó el siguiente péptido de CTLA-4 de la manera descrita más adelante:

- 10 NH₂:MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVT
EVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK VELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPC-
CONH₂

Abreviaturas/materiales

- 15 NMP, N-metilpirrolidinona; TFE, 2,2,2-trifluoroetanol; DCM, diclorometano; Fmoc, fluorenil-metoxicarbonilo. Todos los reactivos fueron suministrados por Perkin Elmer con las excepciones siguientes: TFE, Aldrich Chemical; resina de Fmoc-PAL-PEG, Perseptive Biosystems. Se usaron Fmoc-Arg(PMC)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Lys(BOC)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH y Fmoc-Tyr(tBu)-OH para los aminoácidos que requerían grupos protectores de cadenas laterales.

20 Síntesis peptídica

- La síntesis peptídica se llevó a cabo en un aparato Perkin-Elmer 431a, retroprovisto de control por retroalimentación a través de absorbancia UV a 301 nm (detector de Perkin-Elmer, Modelo 759A). La secuencia peptídica fue ensamblada en una resina de Fmoc-PAL-PEG utilizando ciclos condicionales de copulación doble. Se llevaron a cabo copulaciones dobles forzadas en los ciclos 10, 11, 18, 19, 20 y 28 a 33. La resina fue lavada con una mezcla de DCM y TFE al 50% a la compleción de cada ciclo de acilación, lo que fue seguido del remate terminal de los grupos amino sin reaccionar con anhídrido acético en NMP. Se retiró la resina del reactor después de completarse el ciclo 49 y se continuó el resto hasta la compleción. La escisión del péptido de la resina se llevó a cabo utilizando Reactivo K [King et al., International Journal of Protein and Peptide Research 36:255-266 (1990)] durante 6 horas sobre 415 mg de resina, lo que proporcionó 186 mg de péptido crudo de CTLA-4.

30 Caracterización peptídica

- Se disolvieron partes alícuotas de 25 mg del péptido crudo de CTLA-4 en 5 ml de guanidina-HCl 6 M/K₂PO₃ 100 mM, en un pH de 6,4, y se eluyeron de una columna Hi Load Superdex 75 16/60 (16 mm x 600 mm, volumen de lecho de 120 ml), de Pharmacia, con guanidina-HCl 2 M/K₂PO₃ 100 mM, en un pH de 6,4, con un caudal de 2 ml/min, durante 180 minutos, recogándose fracciones de 5 ml. Las fracciones fueron analizadas cargando 1,7 µl de las fracciones en un gel NuPAGE Laemmli, desarrollándolas con tampón MES de desarrollo y visualizándolas por medio de un protocolo Daichii para tinción con plata. Las fracciones que presentaban un peso molecular de 12 kDa, según se juzgó frente a patrones de peso molecular, fueron reunidas y fueron almacenadas a 4 °C. Las fracciones combinadas fueron analizadas mediante UV y electroforesis en gel. La secuenciación de los aminoácidos fue llevada a cabo haciendo que un cartucho ProSorb (absorbido en una membrana de PVDF) absorbiera una muestra de 100 microlitros y lavando para eliminar las sales del tampón. La secuenciación se llevó a cabo en un aparato Applied Biosystems 420. Se observó la esperada secuencia N-terminal (M H V A Q P A V V L A). Una inmunotransferencia demostró que el péptido era reconocido por el anticuerpo BNI3 anti-CTLA-4 humano (Pharmingen). Para desalar, una parte alícuota que contenían 648 µg de material fue colocada en un tubo de diálisis con un corte de pesos moleculares de 3500 Da y fue dializada frente a TFA al 0,1%/H₂O a 4 °C durante 9 días, con agitación. El contenido completo de la bolsa de diálisis fue liofilizado hasta un polvo.

(iii) Células 300.19 transfectadas con CTLA-4 (Y201V)

- El ADNc de CTLA4 de longitud completa fue multiplicado por PCR a partir de un banco de ADNc de timo humano (Stratagene) y fue subclonado en pIRESneo (Clontech). Utilizando el sistema de mutagénesis MatchMaker (Promega), se introdujo una mutación de CTLA4 que da lugar a una expresión constitutiva en la superficie celular. La mutación de la tirosina Y201 por valina inhibe la unión de la proteína adaptina, AP50, que es responsable de la rápida internalización de CTLA4 [Chuang et al., J. Immunol. 159:144-151 (1997)]. Se cultivaron células de linfoma murino 300.19, exentas de micoplasmas, en RPMI-1640 que contenía suero de ternera fetal al 10%, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomina, glutamina 2 mM, HEPES 12,5 mM, pH de 7,5, y beta-mercaptoetanol 25 µM. Las células fueron sometidas a electroporación (3x10⁶/0,4 ml de RPMI exento de suero) en una cámara de 1 ml de capacidad con 200 µg de CTLA-4-Y201V/pIRESneo, usando 200 V/1180 µF (Gibco CellPorator). Se dejaron las células en reposo durante 10 minutos y luego se añadieron 8 ml de medio RPMI completo previamente calentado. A

las 48 horas, las células fueron diluidas hasta $0,5 \times 10^6$ /ml en medio RPMI completo que contenía 1 mg/ml de G418 (Gibco). Las células resistentes se multiplicaron, y se mostró que expresaban CTLA-4 en la superficie celular al utilizar el anticuerpo BNI3 conjugado con ficoeritrina (Pharmingen). Se aislaron células con alto nivel de expresión mediante separación en estado estéril.

5 Inmunización y generación de hibridomas

Se inmunizaron ratones Xenomouse (de 8 a 10 semanas de edad) (i) subcutáneamente en la base de la cola con 1×10^7 células 300.19 que habían sido transfectadas para que expresaran CTLA-4, como se describió anteriormente, resuspendidas en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) que contenía adyuvante completo de Freund, o (ii) subcutáneamente en la base de la cola con (a) 10 μ g de la proteína de fusión de CTLA-4 o (b) 10 μ g del péptido de CTLA-4, emulsionados con adyuvante completo de Freund. En cada caso, se repitió la dosis tres o cuatro veces en adyuvante incompleto de Freund. Cuatro días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección final del inmunógeno o las células en PBS. Linfocitos de bazo y/o ganglio linfático de los ratones inmunizados fueron fusionados con la línea celular murina P3 de mieloma, no secretora, y fueron sometidos a selección con HAT del modo previamente descrito [G. Galfre y C. Milstein, "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures", *Methods Enzymol.* 73:3-46 (1981)]. Se recuperó un gran conjunto de hibridomas, todos los cuales secretaban anticuerpos IgG2k o IgG4k humanos específicos para CTLA-4 (detección del modo indicado más adelante).

Ensayo ELISA

Se llevó a cabo un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA, del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay) para la determinación de anticuerpos antigénicamente específicos en suero de ratón y en sobrenadantes de hibridomas, del modo descrito [Coligan et al., Unidad 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays" en *Current Protocols in Immunology* (1994)], usando la proteína de fusión CTLA-4-Ig para capturar los anticuerpos. En los animales que se inmunizan con la proteína de fusión CTLA-4-Ig, exploramos además la reactividad inespecífica hacia la porción de Ig humana de la proteína de fusión. Esto se lleva a cabo utilizando placas para ELISA revestidas con IgG1 humana como testigo negativo de la especificidad.

En un ensayo ELISA preferido, se utilizan las técnicas siguientes:

Se revisten placas para ELISA con 100 μ l/pocillo del antígeno en tampón para revestimiento de placas [tampón de carbonato 0,1 M, pH de 9,6, y NaHCO_3 (peso molecular de 84), 8,4 g/l]. Luego se incuban las placas a 4 °C durante la noche. Tras la incubación, se retira el tampón de revestimiento y se bloquea la placa con 200 μ l/pocillo de tampón de bloqueo [albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, bovine serum albumin) al 0,5%, Tween-20 al 0,1% y timerosal al 0,01% en PBS 1x] y se incuba a temperatura ambiental durante 1 hora. Alternativamente, las placas se guardan en una nevera con tampón de bloqueo y dispositivos selladores de placas. Se retira el tampón de bloqueo y se añaden 50 μ l/pocillo de sobrenadante de hibridoma, suero u otro sobrenadante de hibridoma (testigo positivo) y medio HAT o tampón de bloqueo (testigo negativo). Se incuban las placas a temperatura ambiental durante 2 horas. Después de la incubación, se lava la placa con tampón de lavado (PBS 1x). Se añade el anticuerpo de detección [es decir, anti-IgG2 humana-HRP generada en ratón (SB, n° 9070-05) para anticuerpos IgG2, o anti-IgG4 humana-HRP generada en ratón (SB, n° 9200-05) para anticuerpos IgG4] en una cantidad de 100 μ l/pocillo [anti-IgG2 humana-HRP generada en ratón a 1:2000 o anti-IgG4 humana-HRP generada en ratón a 1:1000 (cada uno diluido en tampón de bloqueo)]. Las placas se incuban a temperatura ambiental durante 1 hora y luego se lavan con tampón de lavado. A continuación, se añaden 100 μ l/pocillo de disolución de desarrollo recién preparada [10 ml de tampón de sustrato, 5 mg de OPD (o-fenilendiamina; Sigma, n° P-7288 del catálogo) y 10 μ l de H_2O_2 al 30% (Sigma)] a los pocillos. Se deja que las placas se desarrollen durante 10-20 minutos hasta que los pocillos del testigo negativo apenas empiezan a mostrar color. A continuación, se añaden 100 μ l/pocillo de disolución de parada (H_2SO_4 2 M) y se leen las placas en un lector de placas para ELISA a una longitud de onda de 490 nm.

45 Determinación de las constantes de afinidad de mAbs totalmente humanos por BIAcore

La medición de la afinidad de anticuerpos monoclonales humanos purificados, fragmentos Fab o sobrenadantes de hibridomas por resonancia de plasmones se llevó a cabo utilizando el instrumento BIAcore 2000, usando procedimientos generales esbozados por los fabricantes.

El análisis cinético de los anticuerpos se llevó a cabo usando antígenos inmovilizados en la superficie del sensor con una baja densidad. La proteína de fusión CTLA-4-Ig se inmovilizó en tres superficies del chip sensor BIAcore con una densidad que variaba de aproximadamente 390 a 900 utilizando la proteína de fusión CTLA-4-Ig en una concentración de 20 ó 50 μ g/ml en acetato sódico 10 mM, pH de 5,0, utilizando el kit para copulación de aminas suministrado por el fabricante (BIAcore, Inc.). Se inmovilizó IgG1 (900 UR) en la cuarta superficie del chip sensor BIAcore, que fue utilizada como superficie testigo negativo para la unión inespecífica. Se llevó a cabo el análisis cinético con un caudal de 25 ó 50 microlitros por minuto y, utilizando el software proporcionado por el fabricante (BLA, evaluación 3.0), que permite cálculos Siting globales, se determinaron las velocidades de disociación (k_d o k_{off}) y asociación (k_a o k_{on}).

Ejemplo 2

Medición de la afinidad de los anticuerpos anti-CTLA-4

En la tabla siguiente se proporcionan las mediciones de afinidad para algunos de los anticuerpos seleccionados de este modo.

5

TABLA I

Hibridoma	Fase sólida (por BIAcore)				
	Velocidades de asociación K_a ($M^{-1}s^{-1} \times 10^6$)	Velocidades de disociación K_d ($s^{-1} \times 10^{-4}$)	Constante de asociación $KA(1/M)=k_a/k_d \times 10^{10}$	Constante de disociación $KD(M)=k_d/k_a \times 10^{-10}$	Densidad superficial (UR)
Moab01	0,68	1,01	0,67	1,48	878,7
	0,70	4,66	0,15	6,68	504,5
	0,77	6,49	0,19	8,41	457,2
	0,60	3,08	0,20	5,11	397,8
4.1.1	1,85	0,72	2,58	0,39	878,7
	1,88	1,21	1,55	0,64	504,5
	1,73	1,54	1,13	0,88	457,2
	1,86	1,47	1,26	0,79	397,8
4.8.1	0,32	0,07	4,46	0,22	878,7
	0,31	0,23	1,33	0,75	504,5
	0,28	0,06	4,82	0,21	397,8
4.14.3	2,81	3,04	0,92	1,08	878,7
	2,88	3,97	0,73	1,38	504,5
	2,84	6,66	0,43	2,35	457,2
	3,17	5,03	0,63	1,58	397,8
6.1.1	0,43	0,35	1,21	0,83	878,7
	0,46	0,90	0,51	1,98	504,5
	0,31	0,51	0,61	1,63	457,2
	0,45	0,79	0,57	1,76	397,8
3.1.1	1,04	0,96	1,07	0,93	878,7
	0,95	1,72	0,55	1,82	504,5
	0,73	1,65	0,44	2,27	457,2
	0,91	2,07	0,44	2,28	397,8
4.9.1	1,55	13,80	0,11	8,94	878,7
	1,43	19,00	0,08	13,20	504,5
	1,35	20,50	0,07	15,20	397,8
4.10.2	1,00	2,53	0,39	2,54	878,7
	0,94	4,30	0,22	4,55	504,5
	0,70	5,05	0,14	7,21	457,2
	1,00	5,24	0,19	5,25	397,8

2.1.3	1,24	9,59	0,13	7,72	878,7
	1,17	13,10	0,09	11, 20	504,5
	1,11	13,00	0,09	11, 70	397,8
4.13.1	1,22	5,83	0,21	4,78	878,7
	1,29	6,65	0,19	5,17	504,5
	1,23	7,25	0,17	5,88	397,8

Como se observará, los anticuerpos preparados de acuerdo con la invención poseen elevadas afinidades y constantes de unión.

Ejemplo 3

5 Estructuras de anticuerpos anti-CTLA-4 preparados de acuerdo con la invención

En la siguiente discusión, se proporciona información estructural relacionada con anticuerpos preparados de acuerdo con la invención.

Con objeto de analizar las estructuras de los anticuerpos producidos de acuerdo con la invención, clonamos genes que codificaban los fragmentos de las cadenas pesada y ligera del hibridoma particular. Se llevaron a cabo la clonación génica y la secuenciación del modo siguiente:

Se aisló ARNm poli(A)⁺ de aproximadamente 2x10⁵ células de hibridoma derivadas de ratones XenoMouse inmunizados, utilizando un kit Fast-Track (Invitrogen). La generación de ADNc aleatoriamente cebado fue seguida por PCR. Se utilizaron cebadores de la región variable específica de la familia V_H humana o V_K humana [Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes", Eur. J. Immunol. 21:985-991 (1991)] o un cebador universal de V_H humana, MG-30 (CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG), junto con cebadores específicos para la región constante C_γ2 humana (MG-40d:5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3') o la región constante C_κ (hkP2; como describieron previamente Green et al., 1994). Se obtuvieron secuencias de transcritos de cadenas pesadas y kappa derivadas de mAbs humanos, mediante la secuenciación directa de los productos de PCR generados a partir de ARN poli(A)⁺ utilizando los cebadores anteriormente descritos. También se clonaron los productos de PCR en pCRII usando un kit de clonación TA (Invitrogen) y se secuenciaron ambas cadenas usando kits de secuenciación Prism con terminadores colorantes y un aparato ABI 377 para secuenciación. Todas las secuencias fueron analizadas mediante alineaciones con respecto al "V BASE sequence directory" (Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido) usando los programas informáticos MacVector y Geneworks.

Además, se sometió cada uno de los anticuerpos 4.1.1, 4.8.1, 11.2.1 y 6.1.1 a secuencias de ADN de longitud completa. Para dicha secuenciación, se aisló ARNm poli(A)⁺ de aproximadamente 4x10⁶ células de hibridoma usando el kit ARNm Direct (Dyna). El ARNm fue inversamente transcrito usando oligo-dT (18) y el kit Advantage para RT/PCR (Clontech). Se usó la base de datos de regiones variables (V Base) para diseñar cebadores de multiplicación que comenzaran en el sitio de inicio ATG del gen DP50 de cadena pesada (5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAGTTGGGCTGAGC TG-3') y hasta el codón de parada de la región constante de IgG2 (5'-TTCTCTGATCAGAATTCTATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGCT-3'). Se añadió una secuencia Kozak óptima (ACCGCCACC) en 5' con respecto al sitio de inicio ATG. Se usó el mismo método para diseñar un cebador para el sitio de inicio ATG del gen A27 de cadena kappa (5'-TCTTCAAGCTTGCCCGGGCCCGCCACC-ATGGAACCCAGCGCAG-3') y el codón de parada de la región constante kappa (5'-TTCTTTGATCAGAATTCTACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'). Se clonó el ADNc 012 usando un cebador para el sitio de inicio ATG (5'-TCTTCAAGCTTGCCCGGGCCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGC T-3') y el anterior cebador para el codón de parada de la región constante kappa. Los ADNc de cadenas pesadas fueron también clonados como construcciones genómicas mediante mutagénesis dirigida al sitio, para añadir un sitio NheI al extremo del dominio J variable, y subclonando un fragmento NheI que contenía las regiones genómicas CH₁/bisagra/CH₂/CH₃ de IgG2. La mutación puntual para generar el sitio NheI no altera la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. Se utilizaron las parejas de cebadores para multiplicar los ADNc usando el kit Advantage High Fidelity para PCR (Clontech). Se obtuvo la secuencia del producto de PCR mediante una secuenciación directa usando kits de secuenciación con terminadores colorantes y un aparato ABI para secuenciación. Se clonó el producto de PCR en vectores de expresión de mamífero para pEE-glutamina sintetasa (Lonza) y se secuenciaron tres clones para confirmar las mutaciones somáticas. Para cada clon, se verificó la secuencia de ambas cadenas en al menos tres reacciones. Se generó un anticuerpo 4.1.1 aglicosilado por mutagénesis, dirigida al sitio, de N294Q en el dominio CH2. Se produjeron anticuerpos recombinantes por transfección transitoria de células COS7 en FCS desprovisto de IgG y se purificaron utilizando técnicas estándares con proteína A-Sepharose. Se generaron transfectantes estables por electroporación de células NSO murinas y selección en medios exentos de glutamina. El 4.1.1 recombinante, con o sin glicosilación,

presentaba una especificidad y una afinidad idénticas para CTLA4 en los ensayos ELISA y BIAcore *in vitro*.

Análisis de la utilización génica

En la tabla siguiente se expone la utilización génica evidenciada por clones hibridómicos seleccionados de anticuerpos de acuerdo con la invención.

5

TABLA II

Utilización de genes de cadenas pesadas y ligeras						
Clon	Cadena pesada				Cadena ligera kappa	
	VH	D	JH		VK	JK
4.1.1	DP-50	DIR4 o DIR3	JH4		A27	JK1
4.8.1	DP-50	7-27	JH4		A27	JK3
4.14.3	DP-50	7-27	JH4		A27	JK4 JK3
6.1.1	DP-50	DIR5 o DIR5rc	JH4		A27	JK3
3.1.1.	DP-50	3-3	JH6		012	JK3
4.10.2	DP-50	7-27	JH4		A27	JK3
2.1.3	DP-65	1-26	JH6		A10/A26	JK4
4.13.1	DP-50	7-27	JH4		A27	JK3
11.2.1	DP-50	D1-26	JH6		012	JK3
11.6.1	DP-50	D2-2 o D4	JH6		012	JK3
11.7.1	DP-50	D3-22 o D21-9	JH4		012	JK3
12.3.1.1	DP-50	D3-3 o DXP4	JH6		A17	JK1
12.9.1.1	DP-50	D6-19	JH4		A3/A19	JK4
4.9.1	DP-47	5-24 y/o 6-19	JH4		L5	JK1

Como se observará, se generaron anticuerpos de acuerdo con la presente invención con una fuerte tendencia a la utilización de la región variable de la cadena pesada de DP-50. Al gen DP-50 también se hace referencia como gen de la familia V_H 3-33. Sólo un anticuerpo que fue seleccionado basándose en la unión a CTLA-4 y en ensayos funcionales *in vitro* preliminares mostró una utilización de gen de cadena pesada distinta a la de DP-50. Ese clon, 2.1.3, utiliza una región variable de cadena pesada de DP-65 y tiene un isotipo IgG4. Al gen DP-65 también se hace referencia como gen de la familia V_H 4-31. Por otro lado, el clon 4.9.1, que posee una región variable de cadena pesada de DP-47, se une a CTLA-4 pero no inhibe la unión a B7-1 ni a B7-2. En ratones Xenomouse, hay más de 30 genes funcionales distintos de regiones variables de cadenas pesadas con los que generar anticuerpos. Por lo tanto, la tendencia es indicativa de un motivo de unión preferido de la interacción anticuerpo-antígeno con respecto a las propiedades combinadas de unión al antígeno y actividad funcional.

Análisis de mutaciones

Como se apreciará, el análisis de utilizaciones génicas proporciona sólo una panorámica limitada de la estructura de los anticuerpos. Puesto que las células B de los animales Xenomouse generan estocásticamente transcritos de cadenas pesadas V-D-J o ligeras kappa V-J, hay diversos procesos secundarios que tienen lugar, incluyendo, sin limitación, hipermutaciones somáticas, adiciones de nucleótidos N y extensiones de CDR3. Véanse, por ejemplo, Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), y la Solicitud de Patente de EE.UU. n° de serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996. En consecuencia, para examinar más la estructura de los anticuerpos, se generaron previstas secuencias de aminoácidos de los anticuerpos a partir de los ADNc obtenidos de los clones. Además, se obtuvieron secuencias de aminoácidos N-terminales por medio de secuenciación proteica.

La Figura 1 proporciona las secuencias de nucleótidos y las previstas secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras kappa de los clones 4.1.1 (Figura 1A), 4.8.1 (Figura 1B), 4.14.3 (Figura 1C), 6.1.1 (Figura 1D),

3.1.1 (Figura 1E), 4.10.2 (Figura 1F), 2.1.3 (Figura 1G), 4.13.1 (Figura 1H), 11.2.1 (Figura 1I), 11.6.1 (Figura 1J), 11.7.1 (Figura 1K), 12.3.1.1 (Figura 1L) y 12.9.1.1 (Figura 1M). En las Figuras 1A, 1B y 1D, se obtuvieron secuencias extendidas de los anticuerpos 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1 por clonación de longitud completa de los ADNc, como se describió anteriormente. En dichas Figuras, la secuencia del péptido señal (o las bases que codifican la misma) se indica en negrita, y las secuencias utilizadas para la reacción PCR 5' están subrayadas.

La Figura 2 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-50 (3-33). Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de DP-50 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos en forma sombreada.

La Figura 3 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena pesada del clon 2.1.3 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-65 (4-31). Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de DP-65 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 4 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras kappa de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 4.10.2 y 4.13.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A27. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A27 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada. Las aparentes deleciones en los CDR1s de los clones 4.8.1, 4.14.3 y 6.1.1 se indican con "0s".

La Figura 5 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras kappa de los clones 3.1.1, 11.2.1, 11.6.1 y 11.7.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal 012. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de 012 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 6 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 2.1.3 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A10/A26. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A10/A26 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 7 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 12.3.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A17. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A17 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 8 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 12.9.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A3/A19. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A3/A19 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 22 proporciona una serie de secuencias adicionales de nucleótidos y aminoácidos de las siguientes cadenas de anticuerpo anti-CTLA-4:

4.1.1

cadena pesada de 4.1.1 de longitud completa [ADNc 22(a), ADNc genómico 22(b) y aminoácidos 22(c)];

cadena pesada de 4.1.1 aglicosilada de longitud completa [ADNc 22(d) y aminoácidos 22(e)];

cadena ligera de 4.1.1 [ADNc 22(f) y aminoácidos 22(g)];

4.8.1

cadena pesada de 4.8.1 de longitud completa [ADNc 22(h) y aminoácidos 22(i)];

cadena ligera de 4.8.1 [ADNc 22(j) y aminoácidos 22(k)];

6.1.1

cadena pesada de 6.1.1 de longitud completa [ADNc 22(l) y aminoácidos 22(m)];

cadena ligera de 6.1.1 [ADNc 22(n) y aminoácidos 22(o)];

11.2.1

cadena pesada de 11.2.1 de longitud completa [ADNc 22(p) y aminoácidos 22(q)]; y

cadena ligera de 11.2.1 [ADNc 22(r) y aminoácidos 22(s)].

5 Las secuencias de péptidos señal se muestran en negrita y en texto grande. Los marcos de lectura abiertos de la secuencia de ADN genómico de 4.1.1 de longitud completa [Figura 22(b)] están subrayados. Y las mutaciones introducidas para preparar la cadena pesada de 4.1.1 aglicosilada y el cambio resultante (N294Q) se muestran doblemente subrayadas y con letra negrita {ADNc [Figura 22(b)] y aminoácidos [Figura 22(c)]}.

Ejemplo 4

Análisis de las sustituciones de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras

10 En la Figura 2, que proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-50 (3-33), surge un interesante patrón. Además del hecho de la tendencia hacia DP-50 de cadena pesada en la mayoría de los clones, hay una hipermutación relativamente limitada en los anticuerpos con respecto al gen de la línea germinal DP-50. Por ejemplo, los clones 15 3.1.1 y 11.2.1 no tienen mutaciones. Además, las mutaciones en los otros clones son generalmente cambios conservativos que implican sustituciones de aminoácidos con propiedades similares a las de los aminoácidos de la línea germinal. Las mutaciones en muchas de las secuencias de CDR1 y CDR2 son de naturaleza particularmente conservativa. Tres de las cadenas pesadas representadas en la Figura 2, 4.10.2, 4.13.1 y 4.14.3, proceden claramente de un único proceso de recombinación (es decir, proceden de un idéntico centro terminal) y tienen unas 20 secuencias casi idénticas. Si se consideran estas tres como una sola secuencia, entonces, entre los 10 diferentes anticuerpos que contienen la cadena pesada de DP-50, en CDR1 y CDR2 hay 3 posiciones en que un resto apolar está sustituido por otro resto apolar, 12 en que un resto polar no cargado está sustituido por otro resto polar no cargado, y 1 en que un resto polar cargado está sustituido por otro resto polar cargado. Además, hay dos posiciones en que dos restos que son estructuralmente muy similares, glicocola y alanina, están sustituidos entre sí. Las únicas 25 mutaciones no exactamente conservativas implican tres sustituciones de un resto polar no cargado por un resto polar cargado, y una sustitución de un resto polar por un resto apolar.

Las cadenas ligeras de estos anticuerpos proceden de 5 genes Vk diferentes. El gen A27 es el más representado y es la fuente de 6 cadenas ligeras diferentes. La comparación de estas 6 secuencias revela dos características dignas de mención. En primer lugar, tres de ellas, 4.8.1, 4.14.3 y 6.1.1, contienen supresiones de uno o dos restos en CDR1, un proceso raro. En segundo lugar, hay un fuerte perjuicio para la serina de la posición seis de CDR3 de la línea germinal ya que la serina ha sido sustituida en todas las secuencias. Esto sugiere que una serina en esa 30 posición es incompatible con la unión a CTLA4.

Se apreciará que muchas de las sustituciones de aminoácidos anteriormente identificadas existen en íntima proximidad con, o en, una CDR. Parecería que dichas sustituciones acarrearán cierto efecto sobre la unión del anticuerpo a la molécula de CTLA-4. Además, dichas sustituciones podrían ejercer un efecto significativo sobre la afinidad de los anticuerpos. 35

Ejemplo 5

Análisis de las secuencias de aminoácidos N-terminales de anticuerpos de acuerdo con la invención

40 Con objeto de verificar adicionalmente la composición y la estructura de los anticuerpos de acuerdo con la invención, anteriormente identificados, secuenciamos algunos de los anticuerpos utilizando un secuenciador Perkin-Elmer. Se aislaron tanto las cadenas pesadas como las ligeras kappa de los anticuerpos, se purificaron mediante el uso de técnicas de electroforesis preparativa en gel y electrotransferencia y luego se secuenciaron directamente del modo descrito en el Ejemplo 6. Una mayoría de las secuencias de cadena pesada fueron bloqueadas por su extremo amínico. Por lo tanto, dichos anticuerpos fueron tratados primero con piroglutamato aminopeptidasa y fueron luego 45 secuenciados.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 9. La Figura 9 también proporciona el peso molecular de las cadenas pesadas y ligeras, según se determina mediante espectroscopia de masas (MALDI).

Ejemplo 6

Caracterización adicional de anticuerpos de acuerdo con la invención

50 La Figura 10 proporciona cierta información caracterizadora adicional acerca de ciertos de los anticuerpos de acuerdo con la invención. En la Figura, se resumen datos relacionados con los clones 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.14.3 y 6.1.1. Se proporcionan los datos siguientes: concentración, enfoque isoeléctrico (IEF), SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño, FACS, espectroscopia de masas (MALDI) y secuencias N-terminales de cadenas ligeras.

Generalmente, los datos se generaron del modo siguiente:

Materiales y métodos

La concentración proteica se determinó a 280 nm a partir de un barrido UV (200-350 nm), en el que 1,58 unidades de absorbancia a 280 nm equivalen a 1 mg/ml.

5 La SDS-PAGE se llevó a cabo usando el sistema de electroforesis Novex NuPAGE con un gel NuPAGE al 10% y un tampón de desarrollo MES. Se prepararon las muestras diluyendo 3:1 con tampón de muestras NuPAGE 4x (+/- beta-mercaptoetanol) calentado y se cargaron $\approx 5 \mu\text{g}$ de proteína en el gel. Luego se tiñó el gel con disolución tintórea Brilliant Blue R (Sigma, nº B-6529 del catálogo) y se hicieron estimaciones del peso molecular comparando las bandas teñidas con "Perfect Protein Markers" (Novagen, nº 69149-3 del catálogo).

10 Para la secuenciación N-terminal, las muestras fueron desarrolladas como antes en geles NuPAGE, transferidas a una membrana de inmovilización Pro Blot (Applied Biosystems) y luego teñidas con Coomassie Blue R-250. Las bandas proteicas teñidas fueron escindidas y fueron sometidas a un análisis secuencial mediante la degradación de Edman automatizada en un secuenciador Applied Biosystems 494 Precise HT.

15 El enfoque isoelectrico (IEF) se llevó a cabo utilizando geles Pharmacia IEF 3-9 Phast (nº 17-0543-01 del catálogo). Se diluyeron las muestras en glicerol al 10% hasta $\sim 0,8 \text{ mg/ml}$, se cargó $1 \mu\text{l}$ en gel y luego se tiñó con plata. Las estimaciones del pI se realizaron comparando las bandas teñidas con una gran variedad (pH de 3-10) de patrones para IEF (Pharmacia, nº 17-0471-01 del catálogo).

20 La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se llevó a cabo en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), en el sistema Pharmacia SMART, usando la columna Superdex 75 PC 3.2/30. Las estimaciones de peso molecular se realizaron comparando los tiempos de retención de los picos con los tiempos de retención del gel.

25 Para los estudios por FACS, se prepararon células T periféricas humanas y se estimularon durante 48 horas. Las células T fueron lavadas una vez, resuspendidas en tampón de FACS en una concentración de 1×10^6 células/100 μl y teñidas para la expresión superficial de CD3 con $10 \mu\text{l}$ de anti-CD3-FITC (Immunotech, Marsella, Francia) durante 30 minutos a temperatura ambiental. Las células fueron lavadas dos veces y fueron luego fijadas, permeabilizadas ("Fix and Perm", Caltag) y teñidas para la expresión de CTLA-4 intracelular con $10 \mu\text{l}$ de anti-CD152-PE (Pharmingen). La citometría de flujo se llevó a cabo usando un aparato Becton Dickinson FACSort. Se ajustaron los cuadrantes mediante el análisis de relevantes anticuerpos testigo de isotipo (Caltag).

30 Como se discutió anteriormente, se ha demostrado que los anticuerpos anti-CTLA-4 poseen ciertas potentes actividades de modulación inmune. Se llevaron a cabo los experimentos siguientes con objeto de determinar si los anticuerpos de acuerdo con el presente invento poseían dichas actividades. En general, los experimentos se diseñaron para evaluar la capacidad de los anticuerpos para inhibir la interacción entre moléculas de CTLA-4 y B7, ser selectivos entre CD28 y las moléculas de CTLA-4 y B7, y activar la producción de citocinas de células T, incluyendo, pero sin limitarse a, la expresión de IL-2 y/o IFN- γ . Además, se emprendió el examen de la reactividad cruzada de los anticuerpos de la invención con ciertos tejidos humanos y moléculas de CTLA-4 de otras especies (por ejemplo, ratón y primate).

Ejemplo 7

Elisa de competición: inhibición de la interacción ctna-4/b7-1 o b7-2 por anticuerpos de acuerdo con la invención

35 Se llevó a cabo un ensayo *in vitro* para determinar si anticuerpos de acuerdo con el presente invento eran capaces de inhibir la unión de CTLA-4 con B7-1 o B7-2. Como se apreciará, se esperaba que los anticuerpos de la invención que fuesen capaces de inhibir la unión de CTLA-4 con moléculas de B7 fueran candidatos a la regulación inmune a través de la ruta de CTLA-4. En el ensayo, se utilizaron los siguientes materiales y métodos.

Materiales y métodos

40 Se revistieron placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca, número 439454) con B7-1-Ig(G1) o B7-2-Ig(G1) (Repligen, Inc., Needham, Massachusetts, EE.UU.) 3 nM en PBS de Dulbecco y se incubaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante la noche. El día 2, se retiró la B7-Ig y se bloquearon las placas con BSA al 1% más Tween-20 al 0,05% en D-PBS durante dos horas. Se lavaron 3 veces las placas con tampón de lavado (Tween-20 al 0,05% en D-PBS). Se premezclaron el anticuerpo, en las concentraciones de ensayo apropiadas, y CTLA-4-Ig(G4) (concentración final de $0,3 \text{ nM}$) (Repligen, Inc., Needham, Massachusetts, EE.UU.) durante 15 minutos y luego se añadió la mezcla a la placa revestida con B7-Ig (volumen total de $60 \mu\text{l}$) y se incubó a temperatura ambiental durante 1,5 horas. Se lavaron las placas 3 veces, se añadieron $50 \mu\text{l}$ de una dilución 1 a 1000 de anticuerpo anti-IgG4 humana generado en ratón y marcado con HRP (Zymed, San Francisco, California, EE.UU., nº 05-3820) y se incubó a temperatura ambiental durante 1 hora. Se lavaron las placas 3 veces, se añadieron $50 \mu\text{l}$ de sustrato TMB Microwell para peroxidasa (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, Maryland, EE.UU., nº 50-76-04), se incubó a temperatura ambiental durante 20 minutos y luego se añadieron $50 \mu\text{l}$ de H_2SO_4 1 N a las placas. Se leyeron las placas a 450 nm usando un lector de placas de Molecular Devices (Sunnyvale, California, EE.UU.). Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Se

definió la señal máxima como la unión de CTLA-4-Ig en ausencia de anticuerpo de ensayo. Se definió la unión inespecífica como la absorbancia en ausencia de CTLA-4-Ig y anticuerpo de ensayo.

Los resultados del ensayo se proporcionan en las Tablas IIIA y IIIB. En la Tabla IIIA se muestran los resultados para una diversidad de anticuerpos de acuerdo con la invención. En la Tabla IIIB se muestran los resultados de un experimento distinto en que se compara el anticuerpo 4.1.1 de la invención con el anticuerpo 11.2.1 de la invención.

5

TABLA IIIA

Clon de CTLA-4-Ig	Isotipo	ELISA competitivo para CTLA4/B7-2 IC ₅₀ (nM)	ELISA competitivo para CTLA-4/B7-1 IC ₅₀ (nM)
CT3.1.1	IgG2	0,45 ± 0,07 (n=3)	0,63 ± 0,10 (n=2)
CT4.1.1	IgG2	0,38 ± 0,06 (n=5)	0,50 ± 0,05 (n=2)
CT4.8.1	Ig-G2	0,57 ± 0,03 (n=3)	0,17 ± 0,28 (n=2)
CT4.9.1	IgG2	no competitivo (n=3)	no competitivo (n=2)
CT4.10.2	IgG2	1,50 ± 0,37 (n=3)	3,39 ± 0,31 (n=2)
CT4.13.1	IgG2	0,49 ± 0,05 (n=3)	0,98 ± 0,11 (n=2)
CT4.14.3	IgG2	0,69 ± 0,11 (n=3)	1,04 ± 0,15 (n=2)
CT6.1.1	IgG2	0,39 ± 0,06 (n=3)	0,67 ± 0,07 (n=2)

TABLA IIIB

Clon de CTLA-4-Ig	Isotipo	ELISA competitivo para CTLA4/B7-2 IC ₅₀ (nM)	ELISA competitivo para CTLA-4/B7-1 IC ₅₀ (nM)
CT4.1.1	IgG2	0,55 ± 0,08 (n=4)	0,87 ± 0,14 (n=2)
CT11.2.1	IgG2	0,56 ± 0,05 (n=4)	0,81 ± 0,24 (n=2)

10 Ejemplo 8

Relaciones de selectividad de anticuerpos de la invención con respecto a CTLA-4 frente a CD28 o B7-2

Se llevó a cabo otro ensayo *in vitro* para determinar la selectividad de anticuerpos de la invención con respecto a CTLA-4 frente a CD28 o B7-2. En relación con los experimentos, se utilizaron los materiales y métodos siguientes.

ELISA de selectividad para CTLA-4: Materiales y métodos

15 Se revistió una placa Floro-NUNC (Nunc, número 475515 del catálogo), de 96 pocillos, con cuatro antígenos: CTLA-4/Ig, CD44/Ig, CD28/Ig y B7-2/Ig (antígenos generados de forma doméstica). Se revistió la placa durante la noche, a +4 °C, con los antígenos en una concentración de 1 µg/ml, 100 µl/pocillo, en tampón de bicarbonato sódico 0,1 M, pH de 9,6. Luego se lavó la placa con PBST (PBS + Tween-20 al 0,1%) tres veces utilizando un lavador de placas NUNC. La placa fue bloqueada con PBST + BSA al 0,5% en una cantidad de 150 µl/pocillo. La placa fue incubada a temperatura ambiental durante 1 hora y fue luego lavada tres veces con PBST. A continuación, se diluyeron los anticuerpos anti-CTLA-4 de la invención en bloque, a una concentración de 1 µg/ml, y se añadieron a la placa. La placa fue incubada a temperatura ambiental durante 1 hora y fue luego lavada tres veces con PBST. Los pocillos que contenían los anticuerpos de la invención fueron luego tratados en bloque con 100 µl/pocillo de anti-IgG2 humana-HRP (Southern Biotech, número 9070-05 del catálogo) en una dilución 1:4000. Además, una fila fue tratada con anti-IgG humana (Jackson, número 209-035-088 del catálogo) para normalizar el revestimiento de la placa. Se diluyó este anticuerpo hasta 1:5000 en bloque y se añadió en una cantidad de 100 µl/pocillo. Además, una fila fue tratada con anti-CTLA-4 humano-HRP (Pharmingen, número 345815 del catálogo/conjugado con HRP de encargo) como un testigo positivo. Este anticuerpo fue utilizado en una concentración de 0,05 µg/ml, diluido en bloque. La placa fue incubada a temperatura ambiental durante 1 hora y fue luego lavada tres veces con PBST. Se añadió sustrato quimioluminiscente LBA (Pierce) en una cantidad de 100 µl/pocillo y se incubó la placa durante 5 minutos en un sacudidor de placas. Luego se leyó la placa utilizando un aparato Lumi-Imager para una exposición de 2 minutos.

20

25

30

Ensayo IGEN de selectividad de unión de CTLA-4-Ig: Materiales y métodos

5 Se lavaron Dynabeads M-450 (DynaL A.S., Oslo, Noruega, nº 140.02) 3 veces con tampón de fosfato sódico, pH de 7,4, y se resuspendieron en tampón de fosfato sódico. Se añadieron 1,0 µg de CTLA-4-Ig(G1), 1,0 µg de CD28-Ig(G1) o de 1,0 a 3,0 µg de B7-2-Ig(G1) (Repligen, Inc., Needham, Massachusetts, EE.UU.) a 100 µl de glóbulos y se incubó la mezcla durante la noche en un agitador giratorio a 4 °C. El día 2, los glóbulos fueron lavados 3 veces en BSA al 1% más Tween-20 al 0,05% en PBS de Dulbecco y fueron bloqueados durante 30 minutos. Se diluyeron los glóbulos 1 a 10 con tampón de bloqueo y se añadieron 25 µl de los glóbulos revestidos a tubos de polipropileno de 12 x 75 mm. Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Se añadieron 50 µl de anticuerpo de ensayo (concentración final de 1 µg/ml) o de tampón de bloqueo a los tubos y se incubaron durante 30 minutos en el carrusel del Analizador Origen 1.5 (IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) a temperatura ambiental se revolvió a 100 rpm. Se añadieron 25 µl de anti-IgG1, IgG2 o IgG4 humanas, de origen murino y rutenilado (Zymed, Inc., San Francisco, California, EE.UU., números 05-3300, 05-3500 y 05-3800) (concentración final de 3 µg/ml en un volumen total de 100 µl), a los tubos. Se incubaron los tubos durante 30 minutos a temperatura ambiental en el carrusel se revolvió a 100 rpm. Se añadieron 200 µl de tampón de ensayo Origen (IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland, EE.UU., nº 402-050-03) por tubo, se revolvió brevemente y luego se contaron los tubos en el Analizador Origen y se determinaron las unidades de ECL (electroquimioluminiscencia) de cada tubo. Se determinaron factores de normalización para corregir las diferencias en la unión de las proteínas de fusión a los Dynabeads, y se corrigieron las unidades de ECL en cuanto a la unión inespecífica antes de calcular las relaciones de selectividad.

10

15

20 Los resultados de los ensayos se proporcionan en las Tablas IVA y IVB.

TABLA IVA

Clon	Isotipo	ELISA para CTLA4/CD28	ELISA para CTLA4/B7-2	ELISA para CTLA4/CD44	IGEN para CTLA4/CD28	IGEN para CTLA4/B7-2
3.1.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=1) 195:1 (n=1)
4.1.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2) 485:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1) 261:1 (n=1)	>500:1 (n=1) 107:1 (n=1)
4.8.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2) 190:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=2)
4.9.1	IgG2	>500:1 (n=2) 244:1 (n=1)	>500:1 (n=2) 33:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1)	>500:1 (n=1)
4.10.2	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1)	>500:1 (n=1)
4.13.1	IgG2	>500:1 (n=2) 46:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1) 329:1 (n=1)	>500:1 (n=2)
4.14.3	IgG2	>500:1 (n=2) 80:1 (n=1)	>500:1 (n=2) 10:1 (n=1)	>500:1 (n=2) 126:1 (n=1)	>413:1 (n=1)	>234:1 (n=1)
6.1.1	IgG2	>500:1 (n=2) 52:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=2)

TABLA IVB

Clon	Isotipo	ELISA para CTLA-4/CD26	ELISA para CTLA-4/B7-2	ELISA para CTLA-4/hlgG
4.1.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=3)
11.2.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)

Ejemplo 9

Modelo de señal de células T humanas

Con objeto de definir más la actividad de los anticuerpos de acuerdo con la invención para actuar como reguladores inmunes, desarrollamos ciertos ensayos con células T para cuantificar la potenciación de la producción de IL-2 por células T tras el bloqueo de la señal de CTLA-4 con los anticuerpos. En relación con los experimentos, se utilizaron los materiales y métodos siguientes.

Materiales y métodos

Se prepararon células T humanas recién aisladas utilizando Histopaque (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU., nº A-70543) y T-Kwik (Limpho-Kwik, One Lambda, Canoga Park, California, EE.UU., nº LK-50-T), se estimularon con PHA (fitohemaglutinina purificada, Murex Diagnostics, Ltd., Dartford, Inglaterra, nº HA 16) (1 µg/ml) en medio (RPMI-1640 que contenía L-glutamina, aminoácidos no esenciales MEM, penicilina, estreptomycin, HEPES 25 mM y FBS al 10%), en una concentración de 1×10^6 células/ml, y se incubaron a 37 °C durante 2 días. Se lavaron las células y se diluyeron en medio hasta 2×10^6 células/ml. Se trataron células Raji (linfoma de Burkitt, ATCC humano nº CCL 86 Clase II, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU.) con mitomicina C (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU., nº M-4287; 25 µg/ml) durante una hora a 37 °C. Las células Raji fueron lavadas 4 veces en PBS y fueron resuspendidas hasta 2×10^6 células/ml. Se añadieron blastos de células T humanas (5×10^5 /ml), células Raji (5×10^5 /ml) y anticuerpos anti-CTLA-4 o un anticuerpo testigo isotópicamente correspondiente, en diversas concentraciones, a placas de 96 pocillos para microtitulación y se incubaron las placas a 37 °C durante 72 horas. El volumen total por pocillo fue 200 µl. Setenta y dos horas después de la estimulación, las placas fueron centrifugadas y el sobrenadante separado y congelado para la posterior determinación de IL-2 (kit de ELISA Quantikine para IL-2, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EE.UU., nº D2050) e IFN-γ (kit de ELISA Quantikine para IFN-γ, R&D Systems). Se definió la potenciación citocínica como la diferencia entre los niveles de citocinas en los cultivos que contenían un mAb bloqueante anti-CTLA-4 y los de aquellos que contenían un anticuerpo testigo isotópicamente correspondiente. Para los experimentos por citometría de flujo, las células Raji se lavaron 1 vez con tampón de FACS (PBS que contenía FCS térmicamente inactivado al 2% y azida sódica al 0,025%). Los sedimentos celulares fueron resuspendidos en tampón de FACS en una concentración de 1×10^6 células/100 µl y fueron incubados con 10 µl de anti-CD80-PE (Becton Dickinson, San Jose, California, EE.UU.) o anti-CD86-PE (Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.) durante 30 minutos a temperatura ambiental. Las células fueron lavadas dos veces y fueron resuspendidas en 1 ml de tampón de FACS. Se llevó la citometría de flujo a cabo usando un aparato Becton Dickinson FACSort. Se ajustaron los marcadores de histograma mediante el análisis de relevantes anticuerpos testigo de isotipo (Caltag, Burlingame, California, EE.UU.).

En general, hemos desarrollado un ensayo que puede ser usado para una rápida determinación de la suprarregulación de IL-2 de células T. Como se apreciará, la estimulación de las células T depende de B7 y CD28. Además, los blastos T lavados no crean IL-2 detectable, y las células Raji no crean IL-2 detectable ni siquiera cuando son estimuladas con LPS o PWM. Sin embargo, en combinación, los blastos T conjuntamente cultivados con células Raji pueden modelar los procesos de señalización de B7, CTLA-4 y CD28 y se pueden evaluar los efectos de anticuerpos contra ellos.

La Figura 11 muestra la expresión de B7-1 y B7-2 en células Raji al usar los mAbs anti-CD80-PE y anti-CD86-PE, usando la citometría de flujo (FACS) del modo descrito en el Ejemplo 6.

La Figura 12 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IL-2 en el ensayo con blastos de células T/Raji, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 [BNI3 (Pharmingen) y los anticuerpos 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1 de la invención].

La Figura 13 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IFN-γ en el ensayo con blastos de células T/Raji, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 [BNI3 (Pharmingen) y los anticuerpos 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1 de la invención] (mismas células T de donante).

La Figura 14 muestra la potenciación media de la producción de IL-2 en células T de 6 donantes, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 en el ensayo con blastos de células T/Raji. Es interesante considerar que el mAb CT4.9.1 se une a CTLA-4 pero no bloquea la unión de B7. Por lo tanto, la simple unión a CTLA-4 es en sí insuficiente para proporcionar un anticuerpo funcional de la invención.

La Figura 15 muestra la potenciación media de la producción de IFN-γ en células T de 6 donantes, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 en el ensayo con blastos de células T/Raji.

La Figura 19 muestra una comparación entre los anticuerpos 4.1.1 y 11.2.1 de la invención en una concentración de 30 µg/ml en el ensayo de 72 horas con blastos de células T/Raji, como se describe en este Ejemplo 9 y el ensayo con Superantígeno descrito en el Ejemplo 10.

La Figura 20 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IL-2 inducida por los anticuerpos anti-CTLA4 4.1.1 y 11.2.1 de la invención en el ensayo con blastos de células T/Raji.

La Tabla IVC siguiente proporciona información relativa a la potenciación media y el intervalo de potenciación de la respuesta citocínica en los ensayos con Raji y SEA de la invención. Cada uno de los experimentos incluidos en los resultados se basa en anticuerpo en una dosis de 30 µg/ml y se mide a las 72 horas. Se muestran el número de donantes usados en los experimentos y también las respuestas.

5

TABLA IVC

Ensayo	mAb	Citocina	Potenciación media (pg/ml)	SEM	Intervalo de potenciación (pg/ml)	n	Respuesta de donantes
Blastos de células T/Raji	4.1.1	IL-2	3329	408	0 a 8861	42	19 de 21
Blastos de células T/Raji	4.1.1	IFN-γ	3630	980	600 a 13939	17	13 de 13
Blastos de células T/Raji	11.2.1	IL-2	3509	488	369 a 6424	18	14 de 14
SEA (PBMC)	4.1.1	IL-2	2800	312	330 a 6699	42	17 de 17
SEA (PBMC)	11.2.1	IL-2	2438	366	147 a 8360	25	15 de 15
SEA (sangre completa)	4.1.1	IL-2	6089	665	-168 a 18417	46	15 de 17
SEA (sangre completa)	11.2.1	IL-2	6935	700	-111 a 11803	25	12 de 14

Ejemplo 10

Modelo de señales de células T humanas

10 Desarrollamos un segundo ensayo celular con objeto de cuantificar la potenciación de la suprarregulación de IL-2 en células T tras el bloqueo de la señal de CTLA-4 con los anticuerpos. En relación con los experimentos, se utilizan los siguientes materiales y métodos.

Materiales y métodos

15 Se prepararon PBMC humano usando el sistema Accuspin. Se revistieron previamente placas de microtitulación con un anticuerpo anti-CD3 (Leu4, Becton Dickinson; 60 ng/ml) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Se añadieron las hPBMC a los pocillos en una cantidad de 200000 células por pocillo. Se añadió enterotoxina estafilocócica A (SEA; del inglés, *Staphylococcus enterotoxin A*) (Sigma) a los pocillos en una concentración de 100 ng/ml. Se añadieron los anticuerpos a los pocillos, normalmente en una concentración de 30 µg/ml. Luego se estimularon las células durante 48, 72 ó 96 horas. Se centrifugaron las placas en el punto temporal deseado y se retiraron los sobrenadantes de los pocillos. A continuación, se examinaron los sobrenadantes en cuanto a la producción de IL-2 utilizando un ELISA (R&D Systems).

20 Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 16, 17 y 21. En la Figura 16, se midió la inducción de la producción de IL-2 en hPBMC de 5 donantes 72 horas después de la estimulación. En la Figura 17, se muestran los resultados de la medición en sangre completa, analizándose la diferencia en la inducción de la producción de IL-2 en la sangre de 3 donantes, según se mide a las 72 y 96 horas después de la estimulación.

25 En la Figura 21, se muestra la potenciación de la producción de IL-2 en la sangre completa de 2 donantes, según se mide a las 72 horas después de la estimulación.

Ejemplo 11

Modelo tumoral en animal

30 Hemos establecido un modelo tumoral en animal para el análisis *in vivo* de anticuerpos anti-CTLA-4 murino en cuanto a la inhibición del crecimiento tumoral. En el modelo, se desarrolla un tumor de fibrosarcoma murino y se tratan los animales con anticuerpos anti-CTLA-4 murino. A continuación se proporcionan los materiales y métodos para el establecimiento del modelo.

Materiales y métodos

5 Se inyectaron subcutáneamente 0,2 ml de células tumorales Sa1N (1×10^6) (Baskar, 1995) en la cara dorsal del cuello de hembras de ratón A/J (6-8 semanas de edad). Los días 0, 4, 7 y 14 después de la inyección de las células tumorales, se inyectó intraperitonealmente un anticuerpo anti-CTLA-4 murino o un anticuerpo testigo isotópicamente correspondiente (Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.; 200 μ g/animal). Se realizaron mediciones tumorales en el curso de los experimentos de 3-4 semanas utilizando un calibre electrónico Starret SPC Plus (Athol, Massachusetts, EE.UU.) y se expresó el tamaño tumoral como el área superficial cubierta por el crecimiento tumoral (mm^2).

10 La Figura 18 muestra la inhibición del crecimiento tumoral con un anticuerpo anti-CTLA-4 murino en un modelo tumoral de fibrosarcoma murino. Como se muestra en la Figura 18, los animales tratados con anti-CTLA-4 presentaban una reducción del crecimiento tumoral en comparación con los animales tratados con un anticuerpo testigo de isotipo. En consecuencia, los mAbs anti-CTLA-4 murino eran capaces de inhibir el crecimiento de un fibrosarcoma en un modelo tumoral en ratón.

15 Se espera que los anticuerpos que presenten reactividad cruzada con CTLA4 murino se comporten similarmente en el modelo. Sin embargo, de los anticuerpos la invención de la invención que han sido examinados en cuanto a reactividad cruzada, ninguno presenta reactividad cruzada con CTLA4 murino.

Ejemplo 12

Modelo tumoral en animal

20 Con objeto de investigar adicionalmente la actividad de los anticuerpos de acuerdo con la invención, se diseñó un modelo de xenoinjerto en ratón SCID para ensayar la erradicación de tumores establecidos y sus metástasis derivadas. En el modelo, se proporcionan ratones SCID con células T humanas injertadas y se les implantan células de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCC; del inglés, non-small cell cancer) o carcinoma colorrectal (CC) derivadas del paciente. La implantación se realiza en las almohadillas grasas gonadales de los ratones SCID. Los tumores son dejados crecer y son luego extirpados. Los ratones desarrollan metástasis hepáticas y tumores de tipo humano. Dicho modelo es descrito por Bumpers et al., J. Surgical Res 61:282-288 (1996).

Se espera que los anticuerpos de la invención inhiban el crecimiento de tumores formados en dichos ratones:

Alegre et al., J. Immunol. 157:4762-70 (1996).

Allison and Krummel, Science 270:932-933 (1995).

Balzano et al., Int. J. Cancer Suppl. 7:28-32 (1992).

30 Blair et al. J. Immunol. 160:12-5 (1998).

Blake and Litzzi-Davis, BioConjugate Chem. 3:510-513 (1992).

Boussiotis et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:11059-63 (1993).

Bowie et al., Science 253:164 (1991).

Bruggeman et al., PNAS USA 86:6709-6713 (1989).

35 Bruggeman, M. and Neuberger, M.S., in Methods:A companion to Methods in Enzymology 2:159-165 (Lerner et al., eds., Academic Press (1991)).

Bruggemann et al., "Human antibody production in transgenic mice:expression from 100 kb of the human IgH locus," Eur. J. Immunol. 21:1323-1326 (1991).

40 Bruggemann, M. and Neuberger, M.S., "Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice," Immunology Today 17:391-397 (1996).

Brunet et al., Nature 328:267-270 (1987).

Bumpers et al., J. Surgical Res. 61:282-288 (1996).

Capsey et al., Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY (1988)).

Castan et al., Immunology 90:265-71 (1997).

45 Cepero et al., J.Exp.Med. 188:199-204 (1998).

Chen et al., "Immunoglobulin gene rearrangement in B-cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH

- locus", *International Immunology* 5:647-656 (1993).
- Chen et al., *Cell* 71:1093-1102 (1992).
- Chen et al., *Human Gene Therapy* 5:95-601 (1994).
- Chiswell and McCafferty, *TIBTECH* 10:80-84 (1992).
- 5 Choi et al., "Transgenic mice containing a human heavy chain immunoglobulin gene fragment cloned in a yeast artificial chromosome", *Nature Genetics* 4:117-123 (1993).
- Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).
- Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).
- Chuang et al., *J. Immunol.* 159:144-151 (1997)
- 10 Coligan et al., Unit 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays," in *Current protocols in immunology* (1994).
- Cwirla et al., *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990).
- Dariavach et al. *Eur. J. Immunol.* 18:1901-1905 (1988).
- Dayhoff, M.O., in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10.
- 15 de Boer et al., *Eur.J.Immunol.* 23:3120-5 (1993).
- Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)).
- Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987).
- Fallarino et al., *J. Exp. Med.* 188:205-10 (1998).
- Fanger et al., *Immunol. Methods* 4:72-81 (1994).
- 20 Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986).
- Fishwild et al., "High-avidity human IgG₁ monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice," *Nature Biotech.* 14:845-851 (1996).
- Freeman et al., *J.Exp.Med.* 178:2185-92 (1993).
- Freeman et al. *J. Immunol.* 161:2708-15 (1998).
- 25 Freeman et al., *Science* 262:907-9 (1993).
- Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).
- Galfre, G. and Milstein, C.; "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures," *Methods Enzymol.* 73:3-46 (1981).
- Gorman et al., *P.N.A.S.* 79:6777 (1982).
- 30 Green and Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998).
- Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994).
- Grosschedl et al., *Cell* 41:885 (1985).
- Hanes and Plutchau, *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997).
- Harding et al., *Nature* 356:607-609 (1994).
- 35 Harper et al., *J. Immunol.* 147:1037-44 (1991).
- Hathcock et al., *Science* 262:905-7 (1993).
- Hoganboom et al., *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992).
- Horspool et al., *J.Immunol.* 160:2706-14 (1998).

- Houghten et al., *Biotechniques* 13:412-421 (1992).
- Houghten, *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985).
- Hurwitz et al., *J.Neuroimmunol.* 73:57-62 (1997).
- Hurwitz et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:10067-71 (1998).
- 5 Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).
- Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)).
- Jakobovits et al., "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial-chromosome" *Nature* 362:255-258 (1993).
- 10 Jakobovits, A. et al., "Analysis of homozygous mutant chimeric mice: Deletion of the immunoglobulin heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555 (1993).
- Jakobovits, A., "Humanizing the mouse genome" *Current Biology* 4:761-763 (1994).
- Jakobovits, A., "Production of fully human antibodies by transgenic mice" *Current Opinion in Biotechnology* 6:561-566 (1995).
- 15 Junghans et al., in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)).
- Kabat et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N.I.H. Publication No.91-3242.
- Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1987 and 1991)).
- 20 Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992).
- Krummel and Allison, *J.Exp.Med.* 182:459-65 (1995).
- Krummel et al., *Int.Immunol.*8:519-23 (1996).
- Kuchroo et al., *Cell* 80:707-18 (1995).
- Kwon et al., *PNAS USA* 94:8099-103 (1997).
- 25 LaPlanche et al., *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986).
- Lenschow et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*90:11054-8 (1993).
- Lenschow et al., *Science* 257:789-792 (1992).
- Lin et al., *J.Exp.Med.*188:199-204 (1998).
- Linsley et al., *J.Exp.Med.*176:1595-604 (1992).
- 30 Linsley et al., *J.Exp.Med.* 174:561-569 (1991).
- Linsley et al., *Science* 257:792-795 (1992).
- Liu et al., *J.Immunol.*139:3521 (1987).
- Liu et al., *P.N.A.S.* 84:3439 (1987).
- 35 Lonberg et al., "Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications" *Nature* 368:856-859 (1994).
- Luhder et al., *J.Exp.Med.* 187:427-32 (1998).
- Marasco, *Gene Therapy* 4:11-15 (1997).
- Markees et al., *J.Clin.Invest.*101:2446-55 (1998).
- 40 Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes" *Eur.J.Immuno/.* 21:985-991 (1991).

- McCoy et al., *J.Exp.Med.* 186:183-7 (1997).
- Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).
- Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970).
- Okayama et al., *Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983).
- 5 Parmley and Smith, *Gene* 73:305-318 (1988).
- Pearson and Lipman, *Proc. Natl.Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988).
- Perez et al., *Immunity* 6:411-7 (1997).
- Perrin et al., *Immunol Res* 14:189-99 (1995).
- Perrin et al., *J.Immunol.* 157:1333-6 (1996).
- 10 Pinalla et al., *Biotechniques* 13:901-905 (1992).
- Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)).
- Razi-Wolf et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:11182-6 (1993).
- Remington's Pharmaceutical Sciences* (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularly Chapter 87 by Blaug, Seymour.
- 15 Rizo and Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992).
- Russel et al., *Nuc/. Acids Research* 21:1081-1085 (1993).
- Schwartz, *Cell* 71:1065 (1992).
- Scott, *TIBS* 17:241-245 (1992).
- Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981).
- 20 Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990).
- Stec et al., *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984).
- Stein et al., *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988).
- Taylor et al., "A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins" *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295 (1992).
- 25 Taylor et al., "Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutations and class switching in mice that lack endogenous IgM." *International Immunology* 6:579-591 (1994).
- The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed.; McGraw-Hill, San Francisco (1985)).
- Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991).
- Tivol et al., *Immunity* 3:541-7 (1995).
- 30 Townsend and Allison, *Science* 259:368 (1993).
- Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992).
- Tuaille et al., "Analysis of direct and inverted DJH rearrangements in a human Ig heavy chain transgenic minilocus", *J. Immunol.* 154:6453-6465 (1995).
- 35 Tuaille et al., "Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice:gene-segment use in μ and γ transcripts" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724 (1993).
- Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990).
- Van Parijs et al., *J. Exp. Med.* 186:1119-28 (1997).
- Veber and Freidinger, *TINS* p.392 (1985).
- Vitetta, *Immunol Today* 14:252 (1993).

- Walunas et al., *Immunity* 1:405-13 (1994).
- Walunas et al., *J.Exp.Med.* 183:2541-50 (1996).
- Waterhouse et al., *Science* 270:985-988 (1995).
- Winter and Harris, *Immunol. Today* 14:43-46 (1993).
- 5 Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992).
- Yang et al., *Cancer Res* 57:4036-41 (1997).
- Yi-qun et al., *Int.Immunol.*8:37-44 (1996).
- Zon et al., *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991).
- 10 Zon et al., *Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford-University Press, Oxford England (1991)).
- Fry et al., "Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor", *Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 95:12022-7 (1998).
- Hoffman et al., "A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain", *J. Mol.Biol.*282:195-208 (1998).
- 15 Ginalski et al., "Modelling of active forms of protein kinases:p38-a case study", *Acta Biochim.Pol.*44:557-64 (1997).
- Jouko et al., "Identification of csk tyrosine phosphorylation sites and a tyrosine residue important for kinase domain structure", *Biochem. J.*322:927-35 (1997).
- Singh et al., "Structure-based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic domain of the erbB receptor subfamily of protein tyrosine kinases", *J.Med.Chem.*40:1130-5 (1997).
- 20 Mandel et al., "ABGEN:A knowledge-based automated approach for antibody structure modeling", *Nat.Biotechnol.*14:323-8 (1996).
- Monfardini et al., "Rational design, analysis, and potential utility of GM-CSF antagonists", *Proc.Assoc.Am.Physicians* 108:420-31 (1996).
- 25 Furet et al., "Modelling study of protein kinase inhibitors:binding mode of staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411", *J.Comput.Aided Mol. Des* 9:465-72 (1995).
- Ill et al., "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions", *Protein Eng.*10:949-57 (1997).
- Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6", *EMBO J.*13:5303-9 (1994).
- 30 Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/466.008, presentada el 12 de Enero de 1990
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/574.748, presentada el 29 de Agosto de 1990
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/575.962, presentada el 31 de Agosto de 1990
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/610.515, presentada el 8 de Noviembre de 1990
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/810.279, presentada el 17 de Diciembre de 1991
- 35 Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/853.408, presentada el 18 de Marzo de 1992
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/904.068, presentada el 23 de Junio de 1992
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/919.297, presentada el 24 de Julio de 1992
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/922.649, presentada el 30 de Julio de 1992
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 07/990.860, presentada el 16 de Diciembre de 1992
- 40 Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/031.801, presentada el 15 de Marzo de 1993
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/053.131, presentada el 26 de Abril de 1993

ES 2 706 547 T3

- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/096.762, presentada el 22 de Julio de 1993
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/112.848, presentada el 27 de Agosto de 1993
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/155.301, presentada el 18 de Noviembre de 1993
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/161.739, presentada el 3 de Diciembre de 1993
- 5 Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/165.699, presentada el 10 de Diciembre de 1993
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/209.741, presentada el 9 de Marzo de 1994
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/234.145, presentada el 28 de Abril de 1994
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/724.752, presentada el 2 de Octubre de 1996
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/730.639, presentada el 11 de Octubre de 1996
- 10 Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996
- Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996
- Patente de EE.UU. nº 4.399.216
- Patente de EE.UU. nº 4.681.581
- Patente de EE.UU. nº 4.683.195
- 15 Patente de EE.UU. nº 4.683.202
- Patente de EE.UU. nº 4.735.210
- Patente de EE.UU. nº 4.740.461
- Patente de EE.UU. nº 4.816.397
- Patente de EE.UU. nº 4.912.040
- 20 Patente de EE.UU. nº 4.959.455
- Patente de EE.UU. nº 5.101.827
- Patente de EE.UU. nº 5.102.990 (RE 35.500)
- Patente de EE.UU. nº 5.151.510
- Patente de EE.UU. nº 5.194.594
- 25 Patente de EE.UU. nº 5.434.131
- Patente de EE.UU. nº 5.530.101
- Patente de EE.UU. nº 5.545.806
- Patente de EE.UU. nº 5.545.807
- Patente de EE.UU. nº 5.585.089
- 30 Patente de EE.UU. nº 5.591.669
- Patente de EE.UU. nº 5.612.205
- Patente de EE.UU. nº 5.625.126
- Patente de EE.UU. nº 5.625.825
- Patente de EE.UU. nº 5.633.425
- 35 Patente de EE.UU. nº 5.643.763
- Patente de EE.UU. nº 5.648.471
- Patente de EE.UU. nº 5.661.016

- Patente de EE.UU. nº 5.693.761
Patente de EE.UU. nº 5.693.792
Patente de EE.UU. nº 5.697.902
Patente de EE.UU. nº 5.703.057
5 Patente de EE.UU. nº 5.714.350
Patente de EE.UU. nº 5.721.367
Patente de EE.UU. nº 5.733.743
Patente de EE.UU. nº 5.770.197
Patente de EE.UU. nº 5.770.429
10 Patente de EE.UU. nº 5.773.253
Patente de EE.UU. nº 5.777.085
Patente de EE.UU. nº 5.789.215
Patente de EE.UU. nº 5.789.650
Patente de EE.UU. nº 5.811.097
15 Patente Europea nº EP 0546073 B1
Patente Europea nº EP 0463151 B1, concesión publicada el 12 de Junio de 1996
Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/02190
Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/03918
Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/22645
20 Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/22647
Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/22670
Solicitud de Patente Internacional nº WO 93/00431
Solicitud de Patente Internacional nº WO 93/12227
Solicitud de Patente Internacional nº WO 94/00569
25 Solicitud de Patente Internacional nº WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994
Solicitud de Patente Internacional nº WO 94/25585
Solicitud de Patente Internacional nº WO 94/29444
Solicitud de Patente Internacional nº WO 95/01994
Solicitud de Patente Internacional nº WO 95/03408
30 Solicitud de Patente Internacional nº WO 95/24217
Solicitud de Patente Internacional nº WO 95/33770
Solicitud de Patente Internacional nº WO 96/14436
Solicitud de Patente Internacional nº WO 96/34096, publicada el 31 de Octubre de 1996
Solicitud de Patente Internacional nº WO 97/13852
35 Solicitud de Patente Internacional nº WO 97/20574
Solicitud de Patente Internacional nº WO 97/38137
Solicitud de Patente Internacional nº WO 98/24884

Solicitud de Patente Internacional nº WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998.

Equivalentes

La descripción y los ejemplos anteriores detallan ciertas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores.

- 5 La presente divulgación también puede caracterizarse por los siguientes objetos:
1. Un anticuerpo que es capaz de unirse a CTLA-4, comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos contigua desde dentro de una secuencia FR1 a través de una secuencia FR3 que está codificada por un gen familiar VH3-33 humano y que comprende al menos uno de los aminoácidos sustituidos en las secuencias CDR1, secuencias CDR2, o secuencias marco mostradas en la figura 2.
 - 10 2. El anticuerpo del objeto 1, en donde la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, y SEQ ID NO:70.
 - 15 3. El anticuerpo del objeto 1, además comprende una una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en una secuencia que comprende SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, y SEQ ID NO:71.
 - 20 4. El anticuerpo del objeto 2, además comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en una secuencia que comprende SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, y SEQ ID NO:71.
 - 25 5. Un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:14.
 6. Un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:2 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:15.
 - 30 7. Un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:4 2 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprend SEQ ID NO:17.
 8. Un anticuerpo monoclonal humano aislado que es capaz de de unirse a CTLA-4.
 9. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo es capaz de competir por la unión de CTLA-4 con un anticuerpo seleccionado de un grupo que consiste en 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1, y 12.9.1.1.
 - 35 10. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo posee una especificidad de unión similar sustancialmente a CTLA-4 como un anticuerpo seleccionado de un grupo que consiste en 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1, y 12.9.1.1.
 11. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo s eleecciona de un grupo que consiste en 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1, y 12.9.1.1.
 - 40 12. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo no es un reactivo cruzado con CTLA-4 de especies de mamíferos inferiores.
 13. El anticuerpo del ítem 12, en donde las especies de mamíferos inferiores comprende ratón, rata y conejo.
 14. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo es un reactivo cruzado con CTLA-4 de primates.
 15. El anticuerpo del ítem 14, en donde los primates comprenden monos cinomolgos y rhesus.
 - 45 16. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo posee una selectividad por CTLA-4 sobre CD28, B7-2, CD44, and hlgG1 of greater than about 100:1.
 17. El anticuerpo del ítem 16, en donde la selectividad es alrededor de 500:1 o mayor.
 18. El anticuerpo del ítem 8, en donde la afinidad de unión del anticuerpo es alrededor de 10^{-9} M o mayor.

ES 2 706 547 T3

19. El anticuerpo del ítem 18, en donde la afinidad de unión del anticuerpo es alrededor de 10^{-10} M o mayor.
20. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con un IC_{50} o menor que alrededor 100 nM.
- 5 21. El anticuerpo del ítem 20, en donde el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con un IC_{50} de menor que alrededor de 0,38 nM.
22. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con un IC_{50} de menor que alrededor de 100 nM o mayor.
23. El anticuerpo del ítem 22, en donde el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con un IC_{50} de menor que alrededor de 0,50 nM.
- 10 24. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo mejora la producción de IL-2 en un ensayo blast/Raji de células T en alrededor de 500 pg/ml o más.
25. El anticuerpo del ítem 24, en donde el anticuerpo mejora la producción de IL-2 en un ensayo blast/Raji de células T en alrededor de 3846 pg/ml o más.
- 15 26. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo mejora la producción de IFN- γ en un ensayo blast/Raji de células T en alrededor de 500 pg/ml o más.
27. El anticuerpo del ítem 26, en donde el anticuerpo mejora la producción de IFN- γ en un ensayo blast/Raji de células T en alrededor de 1233 pg/ml o más.
28. El anticuerpo del ítem 8, en donde el anticuerpo induce la producción de IL-2 en un ensayo hPBMC o superantígeno de sangre completa en alrededor de 500 pg/ml o más.
- 20 29. El anticuerpo del ítem 26, en donde el anticuerpo induce la producción de IL-2 en un ensayo hPBMC o superantígeno de sangre completa en alrededor de 1500 pg/ml o más.
30. El anticuerpo del ítem 26, en donde el anticuerpo induce la producción de IL-2 en un ensayo hPBMC o superantígeno de sangre completa en más de alrededor de 30% al control.
- 25 31. El anticuerpo del ítem 26, en donde el anticuerpo induce la producción de IL-2 en un ensayo hPBMC o superantígeno de sangre completa en más de alrededor de 50% en relación al control.
32. Un anticuerpo humanizado que posee una especificidad de unión substancialmente similar a CTLA-4 como un anticuerpo seleccionado de un grupo que consiste en 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1, y 12.9.1.1.
- 30 33. El anticuerpo del ítem 32, en donde el anticuerpo es un reactivo no cruzado con CTLA-4 de especies de mamífero inferior.
34. El anticuerpo del ítem 33, en donde las especies de mamíferos inferiores comprenden ratón, rata y conejo.
35. El anticuerpo del ítem 32, en donde el anticuerpo es un reactivo no cruzado con CTLA-4 de primates.
36. El anticuerpo del ítem 35, en donde los primates comprenden monos cinomolgos y rhesus.
- 35 37. El anticuerpo del ítem 32, en donde el anticuerpo posee una selectividad de CTLA-4 sobre CD28, B7-2, CD44, y hlgG1 de mayor de alrededor de 100:1.
38. EL anticuerpo del ítem 37, en donde la selectividad es alrededor de 500:1 o mayor.
39. El anticuerpo del ítem 32, en donde la afinidad de unión del anticuerpo es alrededor de 10^{-9} M o mayor.
40. El anticuerpo del ítem 39, en donde la afinidad de unión del anticuerpo es alrededor de 10^{-10} M o mayor.
- 40 41. El anticuerpo del ítem 32, en donde el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con un IC_{50} de menos de alrededor de 100 nM.
42. El anticuerpo del ítem 41, en donde el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con un IC_{50} de menos de alrededor de 0,38 nM.
43. El anticuerpo 32, en donde el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con un IC_{50} de menos de alrededor 100 nM o mayor.
- 45 44. El anticuerpo del ítem 43, en donde el anticuerpo inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con un IC_{50} de menos de

alrededor 0,50 nM.

45. El anticuerpo del ítem 32, en donde el anticuerpo mejora la producción de IL-2 en ensayos blast/Raji de células T en alrededor de 500 pg/ml o más.
- 5 46. El anticuerpo del ítem 45, en donde el anticuerpo mejora la producción de IL-2 en ensayos blast/Raji de células T en alrededor de 3846 pg/ml o más.
47. El anticuerpo del ítem 32, en donde el anticuerpo mejora la producción de IFN- γ en ensayos blast/Raji de células T en alrededor de 500 pg/ml o más.
48. El anticuerpo del ítem 47, en donde el anticuerpo mejora la producción de IFN- γ en ensayos blast/Raji de células T en alrededor de 1233 pg/ml o más.
- 10 49. El anticuerpo del ítem 32, en donde el anticuerpo mejora la producción de IL-2 en un ensayo hPBMC o superantígeno de sangre completa en más de alrededor de 500 pg/ml o más.
50. El anticuerpo del ítem 49, en donde el anticuerpo mejora la producción de IL-2 en un ensayo hPBMC o superantígeno de sangre completa en más de alrededor de 1500 pg/ml o más.
- 15 51. El anticuerpo del ítem 32, en donde el anticuerpo mejora la producción de IL-2 en un ensayo hPBMC o superantígeno de sangre completa en más de alrededor de 30% en proporción al control.
52. El anticuerpo del ítem 50, en donde el anticuerpo mejora la producción de IL-2 en un ensayo hPBMC o superantígeno de sangre completa en más de alrededor de 50% en proporción al control.
- 20 53. Un anticuerpo que se une a CTLA-4, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende secuencias FR1, FR2, y FR3 humanas codificadas por el gen humano VH 3-33 familiarmente operable encuadrada con una secuencia CDR1, CDR2, y CDR3, siendo las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 independientemente seleccionadas de secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 ilustradas en la Figura 2.
54. El anticuerpo del ítem 32, que comprende además cualquiera de las mutaciones somáticas de las secuencias FR1, FR2, y FR3 como se ilustran en la Figura 2.
- 25 55. Un anticuerpo que se une a CTLA-4, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende secuencias FR1, FR2, y FR3 humanas codificadas por el gen humano VH 3-33 familiarmente operable encuadrada con una secuencia CDR1, CDR2, y CDR3, cual anticuerpo tiene las siguientes propiedades:
- una afinidad de unión por de CTLA-4 alrededor de 10^{-9} o mayor;
- inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con un IC_{50} de alrededor de 100 nM o menor;
- inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 1 con un IC_{50} de alrededor de 100 nM o menor; y
- 30 mejor la producción de citoquina en un ensayo de células T humanas de 500 pg/ml o más.
56. Un anticuerpo que se une a CTLA-4, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende secuencias FR1, FR2, y FR3 humanas codificadas por el gen humano VH 3-33 familiarmente operable encuadrada con una secuencia CDR1, CDR2, y CDR3 ilustradas en las Figuras 2 y 3, cual anticuerpo tienen las siguientes propiedades:
- 35 una afinidad de unión por de CTLA-4 alrededor de 10^{-9} o mayor;
- inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con un IC_{50} de alrededor de 100 nM o menor;
- inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 1 con un IC_{50} de alrededor de 100 nM o menor; y
- mejora la producción de citoquina en un ensayo de células T humanas de 500 pg/ml o más.
- 40 57. Un sistema celular de cultivo para el ensayo de la estimulación de células T, que comprende un cultivo de blastos de células T humanos co-cultivadas con una línea celular Raji.
58. Un sistema de cultivo celular del ítem 57, en donde los blastos de células T se lava al cultivo anteriormente con la célula lienar Raji.
59. Un ensayo para medir la estimulación de células T, que comprende:
- 45 proporcionar un cultivo de blastos de células T humanos y una línea celular Raji cell line; que pone en contacto el cultivo con un agente, y

medir la producción de citoquina por el cultivo.

60. El ensayo del ítem 59, en donde los blastos de células T se lavan antes del cultivo con la línea celular Raji.
61. El ensayo del ítem 59, en donde la citoquina es IL-2.
62. El ensayo del ítem 59, en donde la citoquina es IFN- γ .
- 5 63. El ensayo del ítem 59, en donde la producción de citoquina se evalúa en un sobrenadante aislado del cultivo.
64. El ensayo del ítem 59, en donde el agente es un anticuerpo.
65. El ensayo del ítem 59, en donde el anticuerpo se une a CTLA-4.
66. Un ensayo funcional para la detección de un resto para la función estimuladora de células T, que comprende:
proporcionar un cultivo de blastos de células T humanos y una línea celular;
- 10 poner en contacto el cultivo con el resto; y
evaluar la producción de citoquina por el cultivo.
67. El ensayo del ítem 66, en donde los blastos de células T se lavan antes del cultivo con la línea celular Raji.
68. El ensayo del ítem 66, en donde la citoquina es is IL-2.
69. El ensayo del ítem 66, en donde la citoquina es IFN- γ .
- 15 70. El ensayo del ítem 66, en donde la producción de citoquina se evalúa en un sobrenadante aislado del cultivo.
71. El ensayo del ítem 66, en donde el resto es un anticuerpo.
72. El ensayo del ítem 66, en donde el anticuerpo se une a CTLA-4.
73. Un ensayo funcional para la detección de un resto para la función estimuladora de células T, que comprende:
blastos de células T y una línea celular Raji y una línea celular Raji con un agente y evaluación de la producción de
citoquinas por el cultivo.
- 20 74. El ensayo del ítem 73, en donde los blastos de células T se lavan antes del cultivo una la línea celular Raji.
75. El ensayo del ítem 73, en donde la citoquina es is IL-2.
76. El ensayo del ítem 73, en donde la citoquina es IFN- γ .
77. El ensayo del ítem 73, en donde la producción de citoquina se evalúa en un sobrenadante aislado del cultivo.
- 25 78. El ensayo del ítem 73, en donde el agente es un anticuerpo.
79. El ensayo del ítem 73, en donde el anticuerpo se une a CTLA-4.
80. Un método para seleccionar un agente para la actividad de estimulación de células T, que comprende:
poner en contacto el agente con un cultivo celular que comprende blastos de células T humanos y una línea celular
Raji; y
- 30 evaluar la producción de citoquinas por el cultivo.
81. El ensayo del ítem 80, en donde los blastos de células T se lavan antes del cultivo una la línea celular Raji.
82. El ensayo del ítem 80, en donde la citoquina es is IL-2.
83. El ensayo del ítem 80, en donde la citoquina es IFN- γ .
84. El ensayo del ítem 80, en donde la producción de citoquina se evalúa en un sobrenadante aislado del cultivo.
- 35 85. El método del ítem 80, en donde el agente es un anticuerpo se une a CTLA-4.
86. Un ensayo para medir la estimulación de células T, que comprende:
proporcionar una población de células mononucleares periféricas humanas o sangre completa humana estimulada
con enterotoxina A de estafilococo.

poner en contacto el cultivo con un agente, y
 medir la producción de citoquina por la población de células.

87. El ensayo del ítem 86, en donde la citoquina es is IL-2.
- 5 88. El ensayo del ítem 86, en donde la producción de citoquina se mide en el sobrenadante aislado de la población celular.
89. El ensayo del ítem 86, en donde el agente es un anticuerpo.
90. El ensayo del ítem 86, en donde el anticuerpo se une a CTLA-4.
91. Un ensayo funcional para la detección de un resto para la función estimuladora de células T, que comprende:
 10 proporcionar una población celular mononucleares de sangre periférica humana o sangre completa estimulada humana con enterotoxina A de estafilococo;
 poner en contacto el cultivo con el resto; y
 evaluar la producción de citoquina por la población celular.
92. El ensayo del ítem 91, en donde la citoquina es is IL-2.
- 15 93. El ensayo del ítem 91, en donde la producción de citoquina se evalúa en un sobrenadante aislado de la población celular.
94. El ensayo del ítem 91, en donde el resto es un anticuerpo.
95. El ensayo del ítem 91, en donde el anticuerpo se une a CTLA-4.
- 20 96. Un ensayo de estimulación de células T para la función inhibitoria de CTLA-4, que comprende poner en contacto una población de células mononucleares de sangre periférica humana o sangre completa estimulada humana con enteroxina A de estafilococo con un agente y evaluar la producción de citoquina por la población celular.
97. El ensayo del ítem 96, en donde la citoquina es is IL-2.
98. El ensayo del ítem 91, en donde la producción de citoquina se evalúa en un sobrenadante aislado de la población celular.
99. El ensayo del ítem 96, en donde el agente es un anticuerpo.
- 25 100. El ensayo del ítem 96, en donde el anticuerpo se une a CTLA-4.
101. Un método para detectar un agente para la actividad estimuladora de células T, que comprende:
 poner en contacto el agente con una población de células mononucleares de sangre periférica humana o sangre completa estimulada humana con enterotoxina A de estafilococo; y
 evaluar la producción de citoquina por la población celular.
- 30 102. El método del ítem 101, en donde la citoquina es IL-2.
103. El método del ítem 101, en donde la producción de citoquina se evalúa en un sobrenadante aislado de la población celular.
104. El método del ítem 101, en donde el agente es un anticuerpo que se une a CTLA-4.

Listado de secuencias

- 35 <110> ABGENIX, INC. PFIZER INC.
 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS PARA CTLA-4
 <130> ABX-PF1 PCT
 <140>PCT/US99/30895
 <141> 1999-12-23
- 40 <150>60/113,647
 <151> 1998-12-23

ES 2 706 547 T3

<160> 147

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 463

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

```

ES 2 706 547 T3

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

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

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 405 410 415

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

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 2

<211> 464

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 706 547 T3

<400> 2

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

ES 2 706 547 T3

100 105 110

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
115 120 125

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
130 135 140

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
145 150 155 160

Val Leu Gln

<210> 4

<211> 463

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Glu
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gly Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
145 150 155 160

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

ES 2 706 547 T3

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

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

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 405 410 415

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

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 5

<211> 169

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 706 547 T3

<400> 5

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

5

<210> 6
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6

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

ES 2 706 547 T3

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 115 120 125
 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165

5 <210> 7
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

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

10 <210> 8
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 706 547 T3

<400> 8

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

<210> 9

- 5 <211> 167
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<220>

- 10 <221> MOD_RES
- <222> (103)
- <223> Cualquier aminoácido

<400> 9

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

ES 2 706 547 T3

<222> (22)

<223> Qualquer aminoácido

<400> 11

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

<210> 12

<211> 174

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 12

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

ES 2 706 547 T3

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Tyr
 85 90 95
 Asp Phe Trp Ser Gly Arg Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170

<210> 13

<211> 163

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

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

His Thr Phe

ES 2 706 547 T3

<210> 14
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 14

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

<210> 15
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 15

ES 2 706 547 T3

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

<210> 16

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 1 5 10 15

ES 2 706 547 T3

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 18
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 18

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

<210> 19
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 19

ES 2 706 547 T3

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

<210> 20
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

5

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

10

ES 2 706 547 T3

			100						105						110	
	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys
			115					120					125			
	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
	130						135					140				
	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu					
	145					150					155					

<210> 21
 <211> 146
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 21

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

10 <210> 22
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

15	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
	1				5					10					15	

ES 2 706 547 T3

<213> Homo sapiens

<400> 24

```

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

```

5 <210> 25
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

10

```

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

```


ES 2 706 547 T3

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtttctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggagggtcac 360
 ttcggctcctt ttgactactg gggccagggg accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc 420
 aaggggcccat cggctctccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccttc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
 gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780
 ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840
 gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
 cataatgccca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960
 gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
 aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
 ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtct 1380
 ccgggtaaat ga 1392

- <210> 28
- <211> 1395
- <212> ADN
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 28

atggagtttg ggctgagctg ggttttctc gttgctctt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtacagcgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccagggtcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt gccagttata tggatgatg gaagtaataa acactatgga 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agtgacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggagagaga 360
 ctggggctct actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
 accaagggcc catcggctct ccccctggcg ccctgtctca ggagcacctc cgagagcaca 480
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac 540
 tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc tccccagctg tcctacagtc ctcaggactc 600
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccga gacctacacc 660
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaagt 720
 tgtgtcagat gccaccctg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctctctcttc 780
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccgacc ctgaggtcac gtgcgtggtg 840
 gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 960
 agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaagggtc 1020
 tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaacctct ccaaaaccaa agggcagccc 1080
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140
 agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctcca tgctggactc cgacggctcc 1260
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcagg gaacgtcttc 1320
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
 tctccgggta aatga 1395

- <210> 29
- 10 <211> 489
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 29

ES 2 706 547 T3

```
cctgggaggt ccctgagact ctctgtgca ggcctggat tcacctcag tagtcatggc 60
atccactggg tccgccaggc tccaggcaag gggctggagt ggggtggcagt tatatgggat 120
gatggaagaa ataaagacta tgcagactcc gtgaagggcc gattcaccat ctccagagac 180
aattccaaga agacgctgta tttgcaaatg aacagcctga gagccgagga cacggctgtg 240
tattactgtg cgagagtggc cccactgggg ccacttgact actggggcca gggaaccctg 300
gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccactcggct tccccctggc gccctgctcc 360
aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 420
ccgtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct 480
gtcctacag                                     489
```

<210> 30
<211> 1392
<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 30

```
atggagtgtt ggctgagctg ggttttctc gttgctctt taagagggtt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtcgagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120
tgtacagcgt ctggattcac cttcagtagt tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagcaataa aactatgca 240
gactccgcga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agccggactg 360
ctgggttact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctctc agcctccacc 420
aagggcccat cggctcttcc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
gccctgggct gcctggtcaa ggactactc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
ggcgctctga ccagcggcgt gcacacctc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
gtcgagtgcc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttccc 780
ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 840
gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 900
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcagttccg tgtggtcagc 960
gtcctcaccg ttgtgacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1020
aaciaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaacaaagg gcagccccga 1080
gaaccacag tgtacacct gcccccctc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc agcagatcg ccgtggagt ggagagcaat 1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccctgc tggactccga cggctcctc 1260
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
tgctccgtga tgcagtggc tctgcacaa cactacacgc agaagagcct ctcctgtct 1380
ccgggtaaat ga                                     1392
```

<210> 31
<211> 507
<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 31

```
ggcgtggtcc agcctgggag gtcctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccttc 60
agtagctatg gcatgcaact ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 120
gttatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaagg ccgattcacc 180
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaa tgaacagcct gagagccgag 240
gacacggctg tgtattactg tgcgagaggg gcccgataa taacccttg tatggacgtc 300
tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggcc atcggctctc 360
ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgctgtgtc 420

aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tctggaact caggcgtct gaccagcggc 480
gtgcacacct tcccagctgt cctacag                                     507
```

15 <210> 32
<211> 501
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 32

ES 2 706 547 T3

```

ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg tagcgtctgg attcatcttc 60
agtagtcatg gcatccactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 120
gttatatggt atgatggaag aaataaagac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc 180
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatttgcaa tgaacagcct gagagccgag 240
gacacggctg tgtattactg tgcgagagt gccccactgg ggccacttga ctactggggc 300
cagggaaacc ttgtaccctg ctccctcagc tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg 360
gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac 420
tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac 480
accttcccag ctgtcctaca g                                     501

```

<210> 33
 <211> 516
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<400> 33

```

tcgggcccag gactggtgaa gccttcacag atcctgtccc tcacctgcac tgtctctggt 60
ggctccatca gcagtgggtg tccactactg agctggatcc gccagcacc agggaagggc 120
ctggagtgga ttgggtacat ctattacatt gggaaacacct actacaacct gtccctcaag 180
agtcgagtta ccatatcagt agacacgtct aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct 240
gtgactgccg cggacacggc cgtgtattat tgtgagagag atagtgggga ctactacggt 300
atagacgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagcttccac caagggccca 360
tccgtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg agcacctccg agagcacagc cgccctgggc 420
tgcttggtca aggactactt ccccgaaacc gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg 480
accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacaa                                     516

```

<210> 34
 <211> 459
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 34

```

cctgggaggt ccctgagact ctctgtgca ggcgtctggt tcaccttcag tagtcatggc 60
atccactggg tccgccaggc tccaggcaag gggctggagt ggggtggcagt tatatggtat 120
gatggaagaa ataaagacta tgcagactcc gtgaagggcc gattcaccat ctccagagac 180
aattccaaga acacgctgta tttgcaaata aacagcctga gagccgagga cacgctgtg 240
tattactgtg cgagagtggc cccactgggg ccacttgact actggggcca gggaaccctg 300
gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc gccctgctcc 360
aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 420
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct ctgaccagc                                     459

```

15 <210> 35
 <211> 503
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 35

```

ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccttc 60
agtagtcatg gcatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 120
gttatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc 180
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaa tgaacagcct gagagccgag 240
gacacggctg tgtattactg tgcgagagat ccgaggggag ctacccttta ctactactac 300
taccggtkcg acgtctgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 360
ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420
ctgggctgcc ttgtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgcctg gaactcaggc 480
gctctgacca gcggcgtgca cac                                     503

```

<210> 36
 <211> 451
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens

ES 2 706 547 T3

<400> 36

```

ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccttc 60
agtagctatg gcatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 120
gttatatggt atgatggaag tcataaatac tatgcagact cctgaaggg cggattcacc 180
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag 240
gacacggctg tgtattactg tgcgagaggc gctgtagtag taccagctgc tatggacgtc 300
tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc 360
cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc 420
aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg t 451

```

<210> 37

5 <211> 438

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> base de datos modificada

10 <222> (64)

<223> a, c, t, g, otra o desconocida

<400> 37

```

gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt 60
agcngtggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt 120
atagtgtctg atggaagtca taaatactat gcagactccg tgaagggccg attcaccatc 180
tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac 240
acggctgtgt attactgtgc gagaggaact atgatagtag tgggtaccct tgactactgg 300
ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca gcctccacca agggcccatc ggtcttccc 360
ctggcgccct gctccaggag cacctccgag agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag 420
gactacttcc ccgaaccg 438

```

15 <210> 38

<211> 562

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 38

20

```

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt tactatggcg tctgggggag gcgtggtcca 60
gcctgggagg tccttgagac tctcctgtgc agcgtctgga ttcaccttca gtagctatgg 120

cgtgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtggcag ttatatggta 180
tgatggaagt aataaatact atgcagactc cgtgaagggc cgattcacca tctccagaga 240
caattccaag agcacgctgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggctgt 300
gtattattgt gcgagagact cgtattacga tttttggagt ggtcggggcg gtatggacgt 360
ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacagcctcc accaagggcc catcggctct 420
cccctggcgc ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca ggggccctgg gctgcctggg 480
caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgctc tgaccagcgg 540
cgtgcacacc ttcccagctg tc 562

```

<210> 39

25 <211> 490

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 39

ES 2 706 547 T3

```

gtccagcctg ggaggtcct gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtaac 60
tatgccatgc actgggtccg ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggtagttatt 120
tggcatgatg gaaataataa atactatgca gagtccgtga agggccgatt caccatctcc 180
agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg 240
gctgtatatt actgtgcgag agatcagggc actggctggt acggaggctt tgacttctgg 300
ggccagggaa ccctggtcac cgtctectca gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc 360
ctgggcacct gctccaggag cacctccgag agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag 420
gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg 480
cacaccttcc                                     490

```

<210> 40
 <211> 708
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 40

```

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcagcttct tagcctggta ccagcagaga 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta cctcaccctg gacgttcggc 360
caagggacca aggtggaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg 600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 708

```

<210> 41
 10 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 41

```

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca ggaccagtggt tagcagcagc tacttagcct ggtaccagca gaaacctggc 180
caggctccca ggctcctcat ctatgggtgca tccagcaggg ccactggcat cccagacagg 240
ttcagtgaggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagact ggagcctgaa 300

```

```

gattttgcag tctattactg tcagcagtat ggcattctcac ctttcacttt cggcggaggg 360
accaaggtgg agatcaagcg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgetgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgctgcg aagtcacca tcagggcctg 660
agctcgcctg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

```

<210> 42
 <211> 417
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 42

ES 2 706 547 T3

ggcaacctgt ctttgtctcc aggggaaaga gccacctct cctgcagggc cagtcagagt 60
 gtcagcagct acttagcctg gtaccagcag aaacctggcc aggctcccag actcctcadc 120
 tatgggtgcat ccagcagggc cactggcatc ccagacaggt tcagtggcag tgggtctggg 180
 acagacttca ctctcaccat cagcagactg gagcctgagg attttgagcgt gtattactgt 240
 cagcagtatg gtaggtcacc attcactttc ggccctggga ccaaagtgga tatcaagcga 300
 actgtggcgt caccatctgt ctctcatctc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 360
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatocca gagaggccaa agtacag 417.

<210> 43
 <211> 705
 <212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 43

atggaaacct cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgta gggccagtc aagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggcccct catctatggt gtatccagca gggccactgg catcccagac 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct 300
 gaagattttg cagtgtatta ctgtcagcag tatggtatct caccattcac tttcggccct 360
 gggaccaaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagc ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 44
 <211> 458
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 44

cagtctccat cctccctgtc tgcactctgta ggagacagag tcaccatcac ttgccgggca 60
 agtcagagca ttaacaccta ttaatttgg tatcagcaga aaccagggaa agcccctaac 120
 ttctgatct ctgtacatc cattttgcaa agtgggtcc catcaagggt ccgtggcagt 180
 ggctctggga caaatttcac tctcaccatc aacagctctc atcctgaaga ttttgcaact 240
 tactactgtc aacagagtta cagtacccca ttactttcg gccctgggac caaagtggat 300
 atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcatcttc cgccatctga tgagcagttg 360
 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 420
 gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tcgggtaa 458

15

<210> 45
 <211> 426
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 45

tctccaggca ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca ccctctcctg cagggccagt 60
 cagagtatta gcagcaattt cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg 120
 ctctcatct atcgtccatc cagcagggcc actggcatcc cagacagttt cagtggcagt 180
 gggctctggga cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgagga ttttgatta 240
 tattactgtc agcagtatgg tacgtcacca ttactttcg gccctgggac caaagtggat 300
 atcaagcga ctgtggctgc accatctgtc ttcatcttc cgccatctga tgagcagttg 360
 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 420
 gtacag 426

<210> 46
 <211> 465
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

ES 2 706 547 T3

<400> 46

```
tctccagact ttcagttctgt gactccaaag gagaaagtca ccatcacctg ccgggccagt 60
cagagcattg gtagtagctt acattgggtat cagcagaaac cagatcagtc tccaaagctc 120
ctcatcaagt atgcttccca gtccttctct ggggtcccct cgaggttcag tggcagtgga 180
tctgggacag atttcaccct caccatcaat agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat 240
tactgtcatc agagtagtag tttaccgctc actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc 300
aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa 360
tctggaactg cctctgttgt gtgctgtctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta 420
cagtggaaag tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggag 465
```

<210> 47

5 <211> 440

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 47

```
cagtctccag gcaccctgtc tttgtctcca ggggaaagag ccaccctctc ctgcagggcc 60
agtcagagtg tcagcagcta cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg 120
ctcctcatct atggtgcata cagcagggcc actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt 180
gggtctggga cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgagga ttttgtagtg 240
tattactgtc aacagtatgg taggtcacca ttcactttcg gccctgggac caaagtagat 300
atcaagcgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcacttcc cgccatctga tgagcagttg 360
aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 420
gtacagtgga aaggtggata 440
```

10

<210> 48

<211> 417

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 48

```
ccatcctccc tgtctgcatc tgtaggagac agagtcacca tcacttgccg ggcaagttag 60
agcattaaca gctatttaga ttggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc taaactcctg 120

atctatgctg catccagttt gcaaagtggg gtcccatcaa ggttcagtgg cagtggatct 180
gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac 240
tgtcaacagt attacagtac tccattcact ttcggccctg ggaccaaagt gaaatcaaa 300
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcata tcccgccat ctgatgagca gtgaaatct 360
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagta 417
```

20

<210> 49

<211> 402

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

25 <221> base de datos modificada

<222> (207)

<223> a, c, t, g, otra o desconocida

<400> 49

```
accagtcctc catcctccct gtctgcatct gtaggagaca gagtcacat cacttgccgg 60
gcaagtcaga acattagcag gtattttaa atggtatcaac agaaccaggg gaaagcccct 120
aagttcctga tctatggtgc atctatcttg caaagtgggg tccatcagg gttcagtgcc 180
agtggatctg ggccagattt cactctnacc atcagcagtc tgcaacctga agattttgca 240
acttactact gtcaacagag ttacagtacc ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg 300
gatatcaaac gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag 360
ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata ac 402
```

30

ES 2 706 547 T3

<210> 50
 <211> 451
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 50

```

accagtctc catcctccct gtctgcatct gtaggagaca gagtcacccat cacttgccgg 60
gcaagtcaga gcatttgcaa ctattttaa atocagtttg caaggtgggg tcccgtcaag gttcagtggc 120
agggtcctga tctatgctgc atocagtttg caaggtgggg tcccgtcaag gttcagtggc 180
agtggatctg ggacagattg cactctcacc atcagcagtc tgcaacctga agattttgca 240
acttactact gtcaacagag ttacactacc ccattcactt tcggccctgg gaccagagtg 300
gatatcgaac gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag 360
ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc 420
aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctat t 451
    
```

<210> 51
 <211> 419
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 51

```

ccactctccc tgcccgtcac ccttggacag cgggcctcca tctcctgcag gtctagtcaa 60
agcctcgat acagtgatgg aaacacctac ttgaattggt ttcagcagag gccaggccaa 120
tctccaaggc gcctaattta taaggtttct aactgggact ctgggggtccc agacagattc 180
agcggcagtg ggtcaggcac tgatttcaca ctgaaaatca gcagggtgga ggctgaggat 240
gttggggttt attactgcat gcaaggttca cactggcctc cgacgttcgg ccaagggacc 300
aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccactctgtc tcatcttccc gccatctgat 360
gagcagttga aatctggaac tgcctctggt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccac 419
    
```

15 <210> 52
 <211> 419
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 52

20

```

cctggagagc cggcttccat ctcttgcagg tctagtcaga gcctcctgca tagtaatgga 60
tacaactatt tggattggta cctgcagaag ccaggacagt ctccacagct cctgatctat 120
ttgggttcta atcgggcctc cggggtcctt gacaggttca gtggcagtg atcaggcaca 180
gattttacac tgaaactcag cagagtggag gctgaggatg ttggggttta ttactgcatg 240
caagctctac aaactcctct cactttcggc ggagggacca aggtggagat caaacgaact 300
gtggctgcac catctgtctt catcttccc ccatctgatg agcagttgaa atctggaact 360
gcctctggtg tgtgcctgct gaataacttc tatccagar aggcxaaagt acattccat 419
    
```

<210> 53
 <211> 1392
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

<400> 53

ES 2 706 547 T3

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgtagcgt ctggattcac cttcagtagc catggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagaaataa atactatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtttctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggaggtcac 360
ttcggtcctt ttgactactg gggccagggg accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc 420
aagggcccat cggctcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
gtcgagtgcc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780
ccaaaaccct aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840
gacgtgagcc acgaagacc cagaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960
gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1020
aacaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaagg gcagccccga 1080
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
gggagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctcctc 1260
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
ccgggtaaat ga 1392

```

<210> 54

<211> 1999

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 54

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgtagcgt ctggattcac cttcagtagc catggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagaaataa atactatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtttctg 300

```

ES 2 706 547 T3

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagagc aggaggtcac 360
 ttcggtcctt ttgactactg gggccagggg accctggtca cegtctcctc agctagcacc 420
 aagggcccat cgggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
 gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttg 720
 cagggagggg ggggtgtctg tggagccag gctcagccct cctgcctgga cgcaccccgg 780
 ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggc agggcccatc tgtctcctca cccggaggcc 840
 tctgcccgcc cactcatgc tcagggagag ggtcttctgg cttttccac caggctccag 900
 gcaggcacag gctgggtgcc cctaccccag gcccttcaca cacaggggca ggtgcttggc 960
 tcagacctgc caaaagccat atccgggagg accctgcccc tgacctaaagc cgaccccaaa 1020
 ggccaaactg tccactccct cagctcggac accttctctc ctcccagatc cgagtaactc 1080
 ccaatcttct ctctgcagag cgcaaatggt gtgtcagagtg cccaccgtgc ccagctaac 1140
 cagcccaggc ctgcctcc agctcaaggc gggacaggtg ccctagagta gcctgcatcc 1200
 agggacaggc cccagctggg tgcagacagc tccacctcca tctctcctc agcaccacct 1260
 gtggcaggac cgtcagctt cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc 1320
 cggacccctg aggtcacgtg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag 1380
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcc agacaaagcc acgggaggag 1440
 cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggtg 1500
 aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa 1560
 accatctcca aaaccaagg tgggaccgc ggggtatgag ggccacatgg acagaggccg 1620
 gctcggccca ccctctgcc tgggagtgac cgctgtgcca acctctgtcc ctacagggca 1680
 gcccgagaa ccacaggtg acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca 1740
 ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggct ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga 1800
 gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacacct cccatgctgg actccgacgg 1860
 ctctctctc ctctacagc agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacct 1920
 cttctcatgc tccgtgatg atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc 1980
 cctgtctccg ggtaaatga

<210> 55
 <211> 1392
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<400> 55

atggagttg ggctgagctg ggttttctc gttgctctt taagaggtg ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgtagcgt ctggattcac cttcagtagc catggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaagggc tggagtggg ggcagttata tggatgatg gaagaaataa atactatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgttctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagagc aggaggtcac 360
 ttcggtcctt ttgactactg gggccagggg accctggtca cegtctcctc agcctccacc 420
 aagggcccat cgggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
 gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttg 720
 gtcgagtgcc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagctt cctcttcccc 780
 ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 840
 gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 900
 cataatgcc agacaaagcc acgggaggag cagttccaaa gcacgttccg tgtggtcagc 960
 gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggtg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
 aacaaaggc tcccagcccc catcgagaaa acctctcca aaaccaagg gcagccccga 1080
 gaaccacagg tgtacacct gcccccctcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
 ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc agcgacatcg cgtggagtg ggagagcaat 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctccatgc tggactccga cggctcctc 1260

ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
 ccgggtaaat ga 1392

10

<210> 56
 <211> 708

ES 2 706 547 T3

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 56

```

atggaaaccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcagcttct tagcctggta ccagcagaga 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta cctcaccttg gacgttcggc 360
caagggacca aggtggaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg 600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
5   ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 708

```

<210> 57
<211> 1395
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 57

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtacagcgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagtaataa aactatgga 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agtgacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgctgag aggagagaga 360
ctggggctct actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggctct ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 480
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttcccogaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtgg gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 660
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaatgt 720
tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 780
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacct ctgaggtcac gtgctggtg 840
gtggacgtga gccacgaaga ccccaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacggt ccgtgtggtc 960
agcgtcctca ccggttgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1080
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140
agcctgacct gcctggtcaa aggttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 1260
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
tctccgggta aatga 1395

```

<210> 58
<211> 702
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <400> 58

ES 2 706 547 T3

```

atggaacc   cagcgagct   tctcttcctc   ctgctactct   ggctcccaga   taccaccgga   60
gaaattgtgt   tgacgcagtc   tccaggcacc   ctgtctttgt   ctccagggga   aagagccacc   120
ctctcctgca   ggaccagtg   tagcagcagc   tacttagcct   ggtaccagca   gaaacctggc   180
caggctccca   ggctcctcat   ctatggtgca   tccagcagg   cactggcat   cccagacagg   240
ttcagtgcca   gtgggtctgg   gacagacttc   actctcacca   tcagcagact   ggagcctgaa   300
gattttgcag   tctattactg   tcagcagtat   ggcatctcac   ctttcaactt   cggcggagg   360
accaaggtgg   agatcaagcg   aactgtggct   gcaccatctg   tcttcatctt   cccgccatct   420
gatgagcagc   tgaactctgg   aactgcctct   gttgtgtgcc   tgctgaataa   cttctatccc   480
agagaggcca   aagtacagtg   gaaggtggat   aacgccctcc   aatcgggtaa   ctcccaggag   540
agtgtcacag   agcaggacag   caaggacagc   acctacagcc   tcagcagcac   cctgacgctg   600
agcaaagcag   actacgagaa   acacaaagtc   tacgctgctg   aagtcaccca   tcagggcctg   660
agctcgcccg   tcacaaagag   cttcaacagc   ggagagtgtt   ag   702

```

<210> 59
 <211> 1392
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 59

```

atggagtttg   ggctgagctg   ggttttcctc   gttgctcttt   taagaggtgt   ccagtgtcag   60
gtgcagctgg   tggagtctgg   gggaggcgtg   gtcgagcctg   ggaggtccct   gagactctcc   120
tgtacagcgt   ctggattcac   cttcagtagt   tatggcatgc   actgggtccg   ccaggctcca   180
ggcaaggggc   tggagtgggt   ggcagttata   tggatgatg   gaagcaataa   aactatgca   240
gactccgcga   agggccgatt   caccatctcc   agagacaatt   ccaagaacac   gctgtatctg   300
caaatgaaca   ccctgagagc   cgaggacagc   gctgtgtatt   actgtgcgag   agccggactg   360
ctgggttact   ttgactactg   gggccaggga   accctggta   ccgtctcctc   agcctccacc   420
aagggcccat   cgtcttccc   cctggcgccc   tgctccagga   gcacctccga   gagcacagcg   480
gccctgggct   gcctggtcaa   ggactacttc   cccgaaccgg   tgacggtgtc   gtggaactca   540
ggcgctctga   ccagcggcgt   gcacaccttc   ccagctgtcc   tacagtcctc   aggactctac   600
tccctcagca   gcgtggtgac   cgtgccctcc   agcaacttcg   gcaccagac   ctacacctgc   660
aacgtagatc   acaagcccag   caacaccaag   gtggacaaga   cagttgagcg   caaatgttgt   720
gtcagtgcc   caccgtgccc   agcaccacct   gtggcaggac   cgtcagtctt   cctcttcccc   780
ccaaaacca   aggacacct   catgatctcc   cggaccctg   aggtcacgtg   cgtgggtgtg   840
gacgtgagcc   acgaagacc   cgaggccag   ttcaactggt   acgtggacg   cgtggaggtg   900
cataatgcca   agacaaagcc   acgggaggag   cagttcaaca   gcagttccg   tgtggtcagc   960
gtcctcaccg   ttgtgcacca   ggactggctg   aacggcaagg   agtacaagt   caaggtctcc   1020
aaciaaggcc   tcccagcccc   catcgagaaa   acctctcca   aaacaaagg   gcagccccga   1080
gaaccacag   tgtacacct   gccccatcc   cgggaggaga   tgaccaagaa   ccaggtcagc   1140
ctgacctgcc   tggtaaaagg   cttctacccc   agcgacatcg   ccgtggagt   ggagagcaat   1200
gggcagccg   agaacaacta   caagaccaca   cctcccatgc   tggactccga   cggctccttc   1260
ttctctaca   gcaagctcac   cgtggacaag   agcaggtggc   agcaggggaa   cgtcttctca   1320
tgctccgtga   tgcagagcc   tctgcacaac   cactacacgc   agaagagcct   ctccctgtct   1380
ccgggtaaat   ga   1392

```

<210> 60
 10 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 60

15 atggaacc cagcgagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

ES 2 706 547 T3

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgta gggccagtca aagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggcccct catctatggt gtatccagca gggccactgg catcccagac 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag actggagcct 300
gaagattttg cagtgtatta ctgtcagcag tatggtatct caccattcac tttcggccct 360
gggaccaaaag tggatatcaa acgaaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgccca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 61
<211> 1413
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<400> 61

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagtaataa atactatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatccgagg 360
ggagctaccc tttactacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 420
accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg 480
agcacctccg agagcacagc ggccctgggc tgccctggta aggactactt ccccgaaccg 540
gtgacgggtg cgtggaactc aggcgctctg accagggcg tgcacacctt cccagctgtc 600
ctacagctct caggactcta ctccctcagc agcgtgggtga ccgtgccctc cagcaacttc 660
ggcaccacga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 720
acagttgagc gcaaagtgtg tgtcgagtgc ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga 780
ccgtcagctc tcctcttccc cccaaaacc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 840
gaggtcacgt gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac 960
agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag 1020
gagtacaagt gcaaggctc caacaaaggc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080
aaaaccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 1140
atgaccaaga accaggctcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctacc cagcgacatc 1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctcccatg 1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1413

<210> 62
10 <211> 714
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 62

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtccagagc attaacagct atttagattg gtatcagcag 180
aaaccagggg aagcccctaa actcctgatc tatgtgcat ccagtttgca aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctctg 300
caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagtatt acagtactcc attcactttc 360
15 ggccttggga ccaaagtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420

ES 2 706 547 T3

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgcoctcca atcgggtaac 540
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
 cagggcctga gctcgcctgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtga 714

<210> 63

<211> 463

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 63

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

ES 2 706 547 T3

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

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

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 405 410 415

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

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 64
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 64

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

ES 2 706 547 T3

Ser Ser His Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly His Phe Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
145 150 155 160

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
210 215 220

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

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

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

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

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

ES 2 706 547 T3

	195		200		205														
Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp				
	210					215					220								
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys				
225					230				235						240				
Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser				
				245					250					255					
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg				
			260					265					270						
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro				
		275					280					285							
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala				
	290					295					300								
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val				
305					310					315					320				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr				
				325					330					335					
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr				
			340					345					350						
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu				
		355					360					365							
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys				
	370					375					380								
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser				
385					390					395					400				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp				
				405					410					415					
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser				
			420					425					430						
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala				
		435					440					445							
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
	450					455					460								

<210> 67
 <211> 233
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

ES 2 706 547 T3

			35					40						45			
Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		
	50											60					
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	His	Tyr	Ala		
65					70					75					80		
Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn		
				85						90				95			
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
			100						105				110				
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly		
		115					120					125					
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser		
	130						135					140					
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala		
145					150					155					160		
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val		
				165					170					175			
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala		
			180					185					190				
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val		
		195					200					205					
Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His		
	210					215					220						
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys		
225					230					235				240			
Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val		
				245					250					255			
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
			260					265					270				
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
		275					280					285					
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
	290					295					300						
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser		
305					310					315					320		
Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
				325					330					335			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
			340					345					350				

ES 2 706 547 T3

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 405 410 415

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

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 69
 <211> 234
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 69

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

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

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Pro Leu Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly
 100 105 110

Ile Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 115 120 125

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

ES 2 706 547 T3

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

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

<210> 70

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 70

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 Trp 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 Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 130 135 140

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

ES 2 706 547 T3

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
 195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
 210 215 220

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 71

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 71

ES 2 706 547 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 Asn Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Ser Thr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 72

<211> 89

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 72

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
 35 40 45

ES 2 706 547 T3

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 50 55 60
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85

<210> 73
 <211> 169
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 73

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

<210> 74
 10 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 74

15 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser

ES 2 706 547 T3

100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
115 120 125

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val
165

<210> 76
<211> 167
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 76

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
1 5 10 15

Gly Phe Ile Phe Ser Ser His Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn
35 40 45

Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
65 70 75 80

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ala Pro Leu Gly Pro Leu
85 90 95

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
100 105 110

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
115 120 125

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165

10 <210> 77
<211> 153
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

ES 2 706 547 T3

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

<210> 78

<211> 163

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 78

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

ES 2 706 547 T3

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 100 105 110

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 115 120 125

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 130 135 140

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 145 150 155 160

Val Leu Gln

<210> 79
 <211> 138
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 79

Gly Gly Val Val Glu Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser
 35 40 45

Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 50 55 60

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 65 70 75 80

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

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
 115 120 125

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135

10 <210> 80
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 80

15 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 1 5 10 15

ES 2 706 547 T3

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
 35 40 45

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 50 55 60

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
 85 90 95

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

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

Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165

<210> 81

<211> 150

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 81

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser His
 35 40 45

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 50 55 60

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Val Val Val Pro Ala
 85 90 95

Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 100 105 110

ES 2 706 547 T3

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 115 120 125

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150

<210> 82
 <211> 146
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 82

Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Ser Ser Cys Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser His Lys
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 50 55 60

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Met Ile Val Val Gly Thr
 85 90 95

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
 115 120 125

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 130 135 140

Glu Pro
 145

10 <210> 83
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 20 25 30

15

ES 2 706 547 T3

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

<210> 84
 <211> 163
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 84

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

ES 2 706 547 T3

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160

His Thr Phe

<210> 85

<211> 76

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 85

Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
 1 5 10 15

Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
 20 25 30

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
 35 40 45

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
 50 55 60

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 65 70 75

<210> 86

10 <211> 172

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ile Leu Ser Leu Thr Cys
 1 5 10 15

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly His Tyr Trp Ser Trp
 20 25 30

Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr
 35 40 45

Tyr Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
 50 55 60

Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser
 65 70 75 80

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly
 85 90 95

Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

15

ES 2 706 547 T3

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
 115 120 125

Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170

<210> 87
 <211> 96
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 87

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

10 <210> 88
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 88

Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
 1 5 10 15

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr
 20 25 30

Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 50 55 60

15 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala

ES 2 706 547 T3

65					70					75				80
Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Trp	Thr	Phe	Gln
				85					90					95
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
			100					105					110	Phe
Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
		115					120					125		Val
Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys		
	130					135					140			

<210> 89
 <211> 141
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 89

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

<210> 90
 10 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90

Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg
1				5					10					15	

15

ES 2 706 547 T3

<400> 92

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

<210> 93

5 <211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

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

10

ES 2 706 547 T3

Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 100 105 110

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 115 120 125

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 130 135 140

Gly Gly
 145

<210> 94

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 94

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Ser Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

<210> 95

10 <211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu Ile Trp Tyr Gln
 20 25 30

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Phe Leu Ile Ser Ala Thr Ser Ile
 35 40 45

Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 50 55 60

15 Asn Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu His Pro Glu Asp Phe Ala Thr

ES 2 706 547 T3

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

<210> 98

<211> 150

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 98

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

ES 2 706 547 T3

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 130 135 140

Lys Val Asp Asn Ala Tyr
 145 150

<210> 99
 <211> 96
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 99

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Gln
 85 90 95

10 <210> 100
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 100

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

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

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

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

15 Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

ES 2 706 547 T3

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

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

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 165 170 175

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 180 185 190

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 195 200 205

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 210 215 220

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 225 230 235 240

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Thr Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 245 250 255

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 260 265 270

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 275 280 285

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 290 295 300

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 305 310 315 320

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

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 340 345 350

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360

<210> 101
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 101

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser
 1 5 10

10 <210> 102
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 706 547 T3

<400> 102

```

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

```

<210> 103

5

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 1           5           10

```

10

<210> 104

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<220>

<221> base de datos modificada

<222> (21)

20

<223> i

<400> 104

caggtgcagc tggagcagtc ngg 23

<210> 105

<211> 24

25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 105

30

gctgagggag tagagtctg agga 24

<210> 106

<211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

 <400> 106
 tatctaagct tctagactcg accgccacca tggagttgg gctgagctg 49

 <210> 107
 <211> 46
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

 <400> 107
 15 ttctctgatc agaattccta tcatttaccg ggagacaggg agagct 46

 <210> 108
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia Kozak óptima

 <400> 108
 accgccacc 9

 <210> 109
 <211> 45
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 109
 tcttcaagct tgcccgggcc cgccaccatg gaaacccccag cgag 45

 <210> 110
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

 <400> 110
 ttcttgatc agaattctca ctaacctct cccctgtga agc 43

 <210> 111
 <211> 48
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

 <400> 111
 45 tcttcaagct tgcccgggcc cgccaccatg gacatgaggg tccccgct 48

 <210> 112
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 50 <400> 112

ES 2 706 547 T3

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

5 <210> 113
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113

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

15 <210> 114
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 706 547 T3

<400> 114

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

5

<210> 115
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 115

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

15

<210> 116
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 706 547 T3

<400> 116

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

5

<210> 117
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 117

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr
 20

15

<210> 118
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 118

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr
 20

20

<210> 119
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 706 547 T3

<400> 119

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr
 20

5 <210> 120
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 120

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

Asp Arg Val Thr
 20

15 <210> 121
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 121

Thr Gly Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Arg
 20

20 <210> 122
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 122

Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr
 20

25 <210> 123
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 123

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr
 20

30 <210> 124
 <211> 20
 <212> PRT

ES 2 706 547 T3

<213> Homo sapiens

<400> 124

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr
20

5 <210> 125
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 125

10 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr
20

<210> 126
<211> 21
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<400> 126

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
20

<210> 127
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 127

Pro Glu Val Gln Phe
1 5

<210> 128
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 128

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
20

<210> 129
<211> 10

ES 2 706 547 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 129

5 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 1 5 10

<210> 130
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 130

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

Ser Leu

<210> 131
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 131

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 1 5

20 <210> 132
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 132

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

Ser Leu Arg Leu
 20

<210> 133
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 133

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
 20

35 <210> 134
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 706 547 T3

<400> 134

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 1 5 10

5 <210> 135
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 135

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

10 Ser Leu Arg Leu Ser
 20

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 136

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 1 5

20 <210> 137
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 137

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

25 Ser Leu Arg Leu Ser
 20

<210> 138
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 138

30 Pro Glu Val Gln Phe Asn
 1 5

<210> 139
 <211> 21
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 139

ES 2 706 547 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser
 20

<210> 140
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 140

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 1 5 10

<210> 141
 10 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 141

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 1 5

<210> 142
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 142

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 1 5

<210> 143
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 143

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 1 5

<210> 144
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 144

35 Thr Gly Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro
 1 5 10

<210> 145
 <211> 8
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 145

ES 2 706 547 T3

Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro
1 5

<210> 146
<211> 8
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 146

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
1 5

<210> 147
10 <211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 147

15 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano que se une a CTLA-4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento compite por la unión a CTLA-4 con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a ligando del mismo tienen las siguientes propiedades:
- 5 a) una afinidad de unión por CTLA-4 de 10^{-9} M o mayor según se determina por BIAcore;
- b) inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con un IC_{50} de 100 nM o menor; y
- c) inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con un IC_{50} de 100 nM o menor,
- en donde el anticuerpo de referencia se selecciona de un grupo que consiste en:
- 10 i) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22;
- ii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:18;
- iii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:14;
- 15 iv) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:15;
- v) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21;
- 20 vi) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:16;
- vii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:17;
- viii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; and
- 25 ix) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO:70.
- 30 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO:22.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:70.
- 35 5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22.
6. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el tratamiento del cancer.
- 40 8. Una línea celular que produce un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. La línea celular de la reivindicación 8 que es una línea celular de mamífero.
10. La línea celular de la reivindicación 9 que es una línea celular CHO o una línea celular NSO.
- 45 11. Un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de cadena ligera y pesada de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

12. Un método para producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende expresar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo en una línea celular huésped y recuperar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.
- 5 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha línea celular hospedadora es una línea celular de mamífero.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha línea celular de mamífero es una línea celular CHO o una línea celular NSO.
15. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento del cancer.
- 10 16. Uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cancer.

Figura 1A**4.1.1. ADN de cadena pesada**

```

ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTCCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT 50
CCAGTGTCCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG 100
GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGTAGCGT CTGGATTCAC CTTCAGTAGC 150
CATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT 200
GGCAGTTATA TGGTATGATG GAAGAAATAA ATACTATGCA GACTCCGTGA 250
AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTTTCTG 300
CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG 350
AGGAGGTCAC TTCGGTCTTT TTGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA 400
CCGTCTCCTC AGCCTCCACC AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCGCCC 450
TGCTCCAGGA GCACCTCCGA GAGCACAGCG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA 500
GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTG GTGGAACCTA GGCGCTCTGA 550
CCAGCGGCGT CCACACCTTC CCAGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC 600
TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAACTTCG GCACCCAGAC 650
CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA 700
CAGTTGAGCG CAAATGTTGT GTCGAGTGCC CACCGTGCCC AGCACCACCT 750
GTGGCAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCCT 800
CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACGTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC 850
ACGAAGACCC CGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG 900
CATAATGCCA AGACAAAGCC ACGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTTCCG 950
TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TTGTGCACCA GGACTGGCTG AACGGCAAGG 1000
AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA 1050
ACCATCTCCA AAACCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT 1100
GCCCCATCC CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC 1150
TGGTCAAAGG CTTTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT 1200
GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCACA CCTCCCATGC TGGACTCCGA 1250
CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC 1300
AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC 1350
CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGGTAAAT GA 1392

```

(SEQ ID NO:27)

4.1.1. Proteína de cadena pesada

```

MEFGLSWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPCRSLRLS CVASGFTFSS 50
HGMHWVRQAP GKGLEWVAVI WYDGRNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLFL 100
QMNSLRAEDT AVYYCARGGH FGFDFYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP 150
CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY 200
SLSSVVTVPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP 250
VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV 300
HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK 350
TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN 400
GQPENNYKTT PPMILSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN 450
HYTQKSLSL S PGK 463

```

(SEQ ID NO:1)

Figura 1A (continuación)

4.1.1. ADN de cadena kappa

```

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCTCT CTGCTACTCT GGCTCCCAGA 50
TACCACCGGA GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT 100
CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTATTAGC 150
AGCAGCTTCT TAGCCTGGTA CCAGCAGAGA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT 200
CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA 250
GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG 300
CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTACTGTCAG CAGTATGGTA CCTCACCTG 350
GACGTTTCGGC CAAGGGACCA AGGTGGAAT CAAACGAACT GTGGCTGCAC 400
CÄTCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAAct 450
GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAG AGGCCAAAGT 500
ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC CAGGAGAGTG 550
TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCTG 600
ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT 650
CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCCTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG 700
AGTGTTAG 708
    
```

(SEQ ID NO:40)

4.1.1. Proteína de cadena kappa

```

METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSI S 50
SSFLAWYQQR PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE 100
PEDFAVYYCQ QYGTSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 150
ASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL 200
TLISKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 235
    
```

(SEQ ID NO:14)

Figura 1B**4.8.1. ADN de cadena pesada**

```

ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTTTCCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT 50
CCAGTGTCCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG 100
GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTACAGCGT CTGGATTCAC CTTCAGTAAC 150
TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT 200
GGCAGTTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ACACTATGGA GACTCCGTGA 250
AGGGCCGATT CACCATCTCC AGTGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG 300
CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG 350
AGGAGAGAGA CTGGGGTCCT ACTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG 400
TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG 450
CCCTGCTCCA GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT 500
CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC 550
TGACCAGCGG CGTGACACCC TTCCCAGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC 600
TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAACT TCGGCACCCA 650
GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA 700
AGACAGTTGA GCGCAAATGT TGTGTGAGT GCCCACCGTG CCCAGCACCA 750
CCTGTGGCAG GACCGTCAGT CTTCTCTTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC 800
CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA 850
GCCACGAAGA CCCCAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG 900
GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCACGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT 950
CCGTGTGGTC AGCGTCTCA CCGTTGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA 1000
AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CCCATCGAG 1050
AAAACCATCT CAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC 1100
CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT 1150
GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC 1200
AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCCA TGCTGGACTC 1250
CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT 1300
GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC 1350
AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGA 1395

```

(SEQ ID NO:28)

4.8.1. Proteína de cadena pesada

```

MEFGLSWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CTASGFTFSN 50
YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI WYDGSNKHYG DSVKGRFTIS SDNSKNTLYL 100
QMNSLRAEDT AVYYCARGER LGSYFDYWQO GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA 150
PCSRSTSEST AALGLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 200
YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC CVECPCPAP 250
PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE 300
VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHODW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE 350
KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES 400
NGQPENNYKT TPPMLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH 500
NHYTQKSLSL SPGK 514

```

(SEQ ID NO:2)

Figura 1B (continuación)

4.8.1. ADN de cadena kappa

```

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA 50
TACCACCGGA GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT 100
CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGACCAGTGT TAGCAGCAGT 150
TACTTAGCCT GGTACCAGCA GAAACCTGGC CAGGCTCCCA GGCTCCTCAT 200
CTATGGTGCA TCCAGCAGGG CCACTGGCAT CCCAGACAGG TTCAGTGGCA 250
GTGGGTCTGG GACAGACTTC ACTCTCACCA TCAGCAGACT GGAGCCTGAA 300
GATTTTGCAG TCTATTACTG TCAGCAGTAT GGCATCTCAC CCTTCACTTT 350
CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAGCG AACTGTGGCT GCACCATCTG 400
TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT 450
GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG 500
GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG 550
AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG 600
AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA 650
TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT 700
AG

```

(SEQ ID NO:41)

4.8.1. Proteína de cadena kappa

```

METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRTSVSSS 50
YLAWYQOKPG QAPRLLIYGA SSRATGIPDR FSGSGSGTDF TLTISRLEPE 100
DFAVYYCQOY GISPFTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS 150
VVCLLNHFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSTLTL 200
SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 233

```

(SEQ ID NO:15)

Figura 1C**4.14.3. ADN de cadena pesada**

```

CCTGGGAGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCA GCGTCTGGAT TCACCTTCAG 50
TAGTCATGGC ATCCACTGGG TCCGCCAGGC TCCAGGCAAG GGGCTGGAGT 100
GGGTGGCAGT TATATGGTAT GATGGAAGAA ATAAAGACTA TGCAGACTCC 150
GTGAAGGGCC GATTACCCAT CTCCAGAGAC AATTCCAAGA AGACGCTGTA 200
TTTGCAAATG AACAGCCTGA GAGCCGAGGA CACGGCTGTG TATTACTGTG 250
CGAGAGTGGC CCCACTGGGG CCACTTGACT ACTGGGGCCA GGGAACCCCTG 300
GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAGGGC CCATCGGTCT TCCCCCTGGC 350
GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG 400
TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT 450
CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCAGCT GTCCTACAG 489

```

(SEQ ID NO:29)

4.14.3. Proteína de cadena pesada

```

PGRSLRLSCA ASGFTFSSHG IHWVRQAPGK GLEWVAWIWY DGRNKDYADS 50
VKGRFTISRD NSKKTLYLQM NSLRAEDTAV YYCARVAPLG PLDYWGQGTL 100
VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA 150
LTSGVHTFPA VLQ 163

```

(SEQ ID NO:3)

4.14.3. ADN de cadena kappa

```

GGCACCCCTGT CTTTGTCTCC AGGGGAAAGA GCCACCCTCT CCTGCAGGGC 50
CAGTCAGAGT GTCAGCAGCT ACTTAGCCTG GTACCAGCAG AAACCTGGCC 100
AGGCTCCCAG ACTCCTCATC TATGGTGCAT CCAGCAGGGC CACTGGCATC 150
CCAGACAGGT TCAGTGGCAG TGGGTCTGGG ACAGACTTCA CTCTACCCAT 200
CAGCAGACTG GAGCCTGAGG ATTTTGCAGT GTATTACTGT CAGCAGTATG 250
GTAGGTCACC ATTCACCTTC GGCCCTGGGA CCAAAGTGA TATCAAGCGA 300
ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT 350
GAAATCTGGA ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA 400
GAGAGGCCAA AGTACAG 417

```

(SEQ ID NO:42)

4.14.3. Proteína de cadena kappa

```

GTLSSLSPGER ATLSCRASQS VSSYLAWYQQ KPGQAPRLLI YGASSRATGI 50
PDRFSGSGSG TDFILTISRL EPEDFAVYYC QQYGRSPFTF GPGTKVDIKR 100
TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQ 139

```

(SEQ ID NO:16)

Figura 1D**6.1.1. ADN de cadena pesada**

```

ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTCCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT 50
CCAGTGTTCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCGAGCCTG 100
GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTACAGCGT CTGGATTCAC CTTCAGTAGT 150
TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT 200
GGCAGTTATA TGGTATGATG GAAGCAATAA ACACTATGCA GACTCCGCGA 250
AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG 300
CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG 350
AGCCGGACTG CTGGGTTACT TTGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA 400
CCGTCTCCTC AGCCTCCACC AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCGCCC 450
TGCTCCAGGA GCACCTCCGA GAGCACAGCG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA 500
GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTG GTGGAActCA GGCCTCTGA 550
CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCAGCTGTCC TACAGTCTTC AGGACTCTAC 600
TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAACTTCG GCACCCAGAC 650
CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA 700
CAGTTAGAGC CAAATGTTGT GTCGAGTGCC CACCGTGCC AGCACCACCT 750
GTGGCAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCT 800
CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACGTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC 850
ACGAAGACCC CGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG 900
CATAATGCCA AGACAAAGCC ACGGGAGGAG CAGTTCAACA GCAGTTCCG 950
TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TTGTGCACCA GGACTGGCTG AACGGCAAGG 1000
AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA 1050
ACCATCTCCA AAACCAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT 1100
GCCCCATCC CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC 1150
TGGTCAAAGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT 1200
GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACA CCTCCCATGC TGGACTCCGA 1250
CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC 1300
AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC 1350
CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGGTAAAT GA 1392

```

(SEQ ID NO:30)

6.1.1. Proteína de cadena pesada

```

MEFGLSWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VEPGRSLRLS CTASGFTFSS 50
YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI WYDGSNKHYA DSAKGRFTIS RDNSKNTLYL 100
QMNSLRAEDT AVYYCARAGL LGYFDYWQOG TLVTVSSAST KGPSVFLAP 150
CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY 200
SLSSVVTVPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP 250
VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV 300
HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK 350
TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN 400
GQPENNYKTT PPMLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN 450
HYTQKSLSL S PGK 463

```

(SEQ ID NO:4)

Figura 1D (continuación)**6.1.1. ADN de cadena kappa**

```

ATGGAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA 50
TACCACCGGA GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT 100
CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGTA GGGCCAGTCA AAGTGTTAGC 150
AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCCCT 200
CATCTATGGT GTATCCAGCA GGGCCACTGG CATCCCAGAC AGGTTTCAGTG 250
GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG ACTGGAGCCT 300
GAAGATTTTG CAGTGTATTA CTGTCAGCAG TATGGTATCT CACCATTCAC 350
TTTCGGCCCT GGGACCAAAG TGGATATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAT 400
CTGTCTTCAT CTTCCCGCCA TCTGATGAGC AGTTGAAATC TGGAAGTCC 450
TCTGTGTGT GCCTGCTGAA TAACTTCTAT CCCAGAGAGG CCAAAGTACA 500
GTGGAAGGTG GATAACGCCC TCCAATCGGG TAACTCCCAG GAGAGTGTCA 550
CAGAGCAGGA CAGCAAGGAC AGCACCTACA GCCTCAGCAG CACCCTGACG 600
CTGAGCAAAG CAGACTACGA GAAACACAAA GTCTACGCCT GCGAAGTCAC 650
CCATCAGGGC CTGAGCTCGC CCGTCACAAA GAGCTTCAAC AGGGGAGAGT 700
GTTAG 705

```

(SEQ ID NO:43)

6.1.1. Proteína de cadena kappa

```

METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS 50
SYLAWYQQKP GQAPRPLIYG VSSRATGIPD RFSGSGSGTD FTLTISRLEP 100
EDFAVYYCQQ YGISPFTFGP GTKVDIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA 150
SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 200
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN 234

```

(SEQ ID NO:17)

Figura 1E**3.1.1. ADN de cadena pesada**

```

GGCGTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG CAGCGTCTGG 50
ATTCACCTTC AGTAGCTATG GCATGCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA 100
AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA GTTATATGGT ATGATGGAAG TAATAAATAC 150
TATGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTACCC ATCTCCAGAG ACAATTCCAA 200
GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACGGCTG 250
TGTATTACTG TGCAGAGAGG GCCCGTATAA TAACCCCTTG TATGGACGTC 300
TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCAGCCTCCA CCAAGGGCCC 350
ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG 400
CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG 450
TCGTGGAACT CAGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCAGCTGT 500
CCTACAG 507

```

(SEQ ID NO:31)

3.1.1. Proteína de cadena pesada

```

GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY 50
YADSVKGRFT ISRDNKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG ARIITPCMDV 100
WGQGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV 150
SWNSGALTSG VHTFPAVLQ 169

```

(SEQ ID NO:5)

3.1.1. ADN de cadena kappa

```

CAGTCTCCAT CCTCCCTGTC TGCATCTGTA GGAGACAGAG TCACCATCAC 50
TTGCCGGGCA AGTCAGAGCA TTAACACCTA TTTAATTTGG TATCAGCAGA 100
AACCAGGGAA AGCCCCTAAC TTCCTGATCT CTGCTACATC CATTTTGCAA 150
AGTGGGGTCC CATCAAGGTT CCGTGGCAGT GGCTCTGGGA CAAATTCAC 200
TCTCACCATC AACAGTCTTC ATCCTGAAGA TTTTGCAACT TACTACTGTC 250
AACAGAGTTA CAGTACCCCA TTCACTTTCC GCCCTGGGAC CAAAGTGGAT 300
ATCAAACGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA 350
TGAGCAGTTS AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT 400
TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA 450
TCGGGTAA 458

```

(SEQ ID NO:44)

3.1.1. Proteína de cadena kappa

```

QSPSSLSASV GDRVITICRA SQSINTYLIW YQKPGKAPN FLISATSILO 50
SGVPSRFRGS GSGTNFTLTI NSLHPEDFAT YYCQSYSTP PTFGPGTKVD 100
IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ 150
SG 152

```

(SEQ ID NO:18)

Figura 1F**4.10.2. ADN de cadena pesada**

```

GGCGTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG TAGCGTCTGG 50
ATTCATCTTC AGTAGTCATG GCATCCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA 100
AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA GTTATATGGT ATGATGGAAG AAATAAAGAC 150
TATGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTCACC ATCTCCAGAG ACAATTCCAA 200
GAACACGCTG TATTTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACGGCTG 250
TGTATTACTG TGCGAGAGTG GCCCACTGG GGCCAATTGA CTACTGGGGC 300
CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCCTCAGCC TCCACCAAGG GCCCATCGGT 350
CTTCCCCCTG GCGCCCTGCT CCAGGAGCAC CTCCGAGAGC ACAGCGGCCC 400
TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCTGTG 450
AACTCAGGCG CTCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCAG CTGTCTTACA 500
G 501

```

(SEQ ID NO:32)

4.10.2. Proteína de cadena pesada

```

GVVQPGRSLR LSCVASGFIF SSHGIHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGRNKD 50
YADSVKGRFT ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARV AFLGPLDYWG 100
QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW 150
NSGALTSGVH TFPVQLQ 167

```

(SEQ ID NO:6)

4.10.2. ADN de cadena kappa

```

TCTCCAGGCA CCTGTCTTT GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCTCTCCTG 50
CAGGGCCAGT CAGAGTATTA GCAGCAATTT CTTAGCCTGG TACCAGCAGA 100
AACCTGGCCA GGCTCCCAGG CTCCTCATCT ATCGTCCATC CAGCAGGGCC 150
ACTGGCATCC CAGACAGTTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTAC 200
TCTCACCATC AGCAGACTGG AGCCTGAGGA TTTTGCATTA TATTACTGTC 250
AGCAGTATGG TACGTCACCA TTCACTTTCG GCCCTGGGAC CAAAGTGGAT 300
ATCAAGCGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA 350
TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT 400
TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAG 426

```

(SEQ ID NO:45)

4.10.2. Proteína de cadena kappa

```

SPGTLSSLSPG ERATLSCRAS QSISSNFLAW YQKPGQAPR LLIYRPSSRA 50
TGIPDSFSGS GSGTDFTLTI SRLEPEDFAL YYCQYGTSP FTFPGTKVD 100
IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRVAK VQ 142

```

(SEQ ID NO:19)

Figura 1G**2.1.3. ADN de cadena pesada**

```

TCGGGCCCCAG GACTGGTGA  GCCTTCACAG  ATCCTGTCCC  TCACCTGCAC  50
TGTCTCTGGT  GGCTCCATCA  GCAGTGGTGG  TCACTACTGG  AGCTGGATCC  100
GCCAGCACCC  AGGGAAGGGC  CTGGAGTGG  TTGGGTACAT  CTATTACATT  150
GGGAACACCT  ACTACAACCC  GTCCCTCAAG  AGTCGAGTTA  CCATATCAGT  200
AGACACGTCT  AAGAACCAGT  TCTCCCTGAA  GCTGAGCTCT  GTGACTGCCG  250
CGGACACGGC  CGTGTATTAT  TGTGCGAGAG  ATAGTGGGGA  CTACTACGGT  300
ATAGACGTCT  GGGGCCAAGG  GACCACGGTC  ACCGTCTCCT  CAGCTTCCAC  350
CAAGGGCCCA  TCCGTCTTCC  CCCTGGCGCC  CTGCTCCAGG  AGCACCTCCG  400
AGAGCACAGC  CGCCCTGGGC  TGCCTGGTCA  AGGACTACTT  CCCC GAACCG  450
GTGACGGTGT  CGTGGAACTC  AGGCGCCCTG  ACCAGCGGCG  TGCACACCTT  500
CCCGGCTGTC  CTACAA  516

```

(SEQ ID NO:33)

2.1.3. Proteína de cadena pesada

```

SGPGLVKPSQ  ILSLTCTVSG  GSISSGGHYW  SWIRQHPGKG  LEWIGYIYYI  50
GNTYYNPSLK  SRVTISVDTS  KNQFSLKLSS  VTAADTAVYY  CARDSGDYYG  100
IDVWQGQTTV  TVSSASTKGP  SVFPLAPCSR  STSESTAALG  CLVKDYFPEP  150
VTVSWNSGAL  TSGVHTFPAV  LQ  172

```

(SEQ ID NO:7)

2.1.3. ADN de cadena kappa

```

TCTCCAGACT  TTCAGTCTGT  GACTCCAAAG  GAGAAAGTCA  CCATCACCTG  50
CCGGGCCAGT  CAGAGCATTG  GTAGTAGCTT  ACATTGCTAT  CAGCAGAAAC  100
CAGATCAGTC  TCCAAAGCTC  CTCATCAAGT  ATGCTTCCCA  GTCCTTCTCT  150
GGGGTCCCCT  CGAGGTTTCA  TGGCAGTGG  TCTGGGACAG  ATTTCCACCCT  200
CACCATCAAT  AGCCTGGAAG  CTGAAGATGC  TGCAACGTAT  TACTGTCATC  250
AGAGTAGTAG  TTTACCGCTC  ACTTTCGGCG  GAGGGACCAA  GGTGGAGATC  300
AAACGAAGT  TGGCTGCACC  ATCTGTCTTC  ATCTTCCC GC  CATCTGATGA  350
GCAGTTGAAA  TCTGGAAGT  CCTCTGTTGT  GTGCCTGCTG  AATAACTTCT  400
ATCCCAGAGA  GGCCAAAGTA  CAGTGAAGG  TGGATAACGC  CCTCCAATCG  450
GGTAACTCCC  AGGAG  465

```

(SEQ ID NO:46)

2.1.3. Proteína de cadena kappa

```

SPDFQSVTPK  EKVITICRAS  QSIGSSLHWY  QQKPDQSPKL  LIKYASQSFS  50
GVPSRFSGSG  SGTDFTLTIN  SLEAEDAATY  YCHQSSSLPL  TFGGGTKVEI  100
KRTVAAPSVF  IFPPSDEQLK  SGTASVCLL  NNFYPREKV  QWKVDNALQS  150
GNSQE  155

```

(SEQ ID NO:20)

Figura 1H**4.13.1. ADN de cadena pesada**

```

CCTGGGAGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCA GCGTCTGGAT TCACCTTCAG 50
TAGTCATGGC ATCCACTGGG TCCGCCAGGC TCCAGGCAAG GGGCTGGAGT 100
GGGTGGCAGT TATATGGTAT GATGGAAGAA ATAAAGACTA TGCAGACTCC 150
GTGAAGGGCC GATTCACCAT CTCCAGAGAC AATTCCAAGA ACACGCTGTA 200
TTTGCAAATG AACAGCCTGA GAGCCGAGGA CACGGCTGTG TATTACTGTG 250
CGAGAGTGGC CCCACTGGGG CCACTTGACT ACTGGGGCCA GGAACCCTG 300
GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAGGGC CCATCGGTCT TCCCCCTGGC 350
GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG 400
TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT 450
CTGACCAGC 459

```

(SEQ ID NO:34)

4.13.1. Proteína de cadena pesada

```

PGRSLRLSCA ASGFTFSSHG IHWVRQAPGK GLEWVAWIWY DGRNKDYADS 50
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAV YYCARVAPLG PLDYWGQGTLL 100
VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA 150
LTS 153

```

(SEQ ID NO:8)

4.13.1. ADN de cadena kappa

```

CAGTCTCCAG GCACCCTGTC FTTGTCTCCA GGGGAAAGAG CCACCCTCTC 50
CTGCAGGGCC AGTCAGAGTG TCAGCAGCTA CTTAGCCTGG TACCAGCAGA 100
AACCTGGCCA GGCTCCCAGG CTCCTCATCT ATGGTGCATC CAGCAGGGCC 150
ACTGGCATCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC 200
TCTCACCATC AGCAGACTGG AGCCTGAGGA TTTTGCAGTG TATTACTGTC 250
AACAGTATGG TAGGTCACCA TTCACTTTCG GCCCTGGGAC CAAAGTAGAT 300
ATCAAGCGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA 350
TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT 400
TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AAGGTGGATA 440

```

(SEQ ID NO:47)

4.13.1. Proteína de cadena kappa

```

QSPGTLISLSP GERATLSCRA SQSVSSYLAW YQKPGQAPR LLIYGASSRA 50
TGIPDRFSGS GSGTDFTLTI SRLEPEDFAV YYCQYGRSP FTFGPGTKVD 100
IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYYPREAK VQWKGG 146

```

(SEQ ID NO:21)

Figura 11

11.12.1. ADN de cadena pesada

```

GGCGTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG CAGCGTCTGG 50
ATTCACCTTC AGTAGCTATG GCATGCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA 100
AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA GTTATATGGT ATGATGGAAG TAATAAATAC 150
TATGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTCACC ATCTCCAGAG ACAATTCCAA 200
GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACGGCTG 250
TGTATTACTG TGCGAGAGAT CCGAGGGGAG CTACCCTTTA CTACTACTAC 300
TACCGGKTGG ACGTCTGGGG CCAAGGGACC ACGGTCACCG TCTCCTCAGC 350
CTCCACCAAG GSCCCATCGG TCTTCCCCTT GCGGCCCTGC TCCAGGAGCA 400
CCTCCGAGAG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC 450
GAACCGGTGA CGGTGTCTGT GAACTCAGGC GCTCTGACCA GCGGCGTGA 500
CAC 503
    
```

(SEQ ID NO:35)

11.2.1. Proteína de cadena pesada

```

GVVQGRSLR LSAAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY 50
YADSVKGRFT ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY 100
YRXDVWGQGT TVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP 150
EPVTVSWNSG ALTSGVH
    
```

(SEQ ID NO:9)

11.2.1. ADN de cadena kappa

```

CCATCCTCCC TGTCTGCATC TGTAGGAGAC AGAGTCACCA TCACTTGCCG 50
GGCAAGTCAG AGCATTACA GCTATTTAGA TTGGTATCAG CAGAAACCAG 100
GGAAAGCCCC TAAACTCCTG ATCTATGCTG CATCCAGTTT GCAAAGTGGG 150
GTCCCATCAA GGTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACAGATT TCACTCTCAC 200
CATCAGCAGT CTGCAACCTG AAGATTTTGC AACTTACTAC TGTCAACAGT 250
ATTACAGTAC TCCATTCACT TTCGGCCCTG GGACCAAAGT GGAAATCAAA 300
CGAACTGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCC GCCAT CTGATGAGCA 350
GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC 400
CCAGAGAGGC CAAAGTA 417
    
```

(SEQ ID NO:48)

11.2.1. Proteína de cadena kappa

```

PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG 50
VPSRFSGSGS GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQYYSTPFT FGPGTKVEIK 100
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKV 139
    
```

(SEQ ID NO:22)

Figura 1J**11.6.1. ADN de cadena pesada**

```

GGCGTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG CAGCGTCTGG 50
ATTCACCTTC AGTAGCTATG GCATGCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA 100
AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA GTTATATGGT ATGATGGAAG TCATAAATAC 150
TATGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTCACC ATCTCCAGAG ACAATTCCAA 200
GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACGGCTG 250
TGTATTACTG TCGGAGAGGC GCTGTAGTAG TACCAGCTGC TATGGACGTC 300
TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCAGCCTCCA CCAAGGGCCC 350
ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG 400
CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG 450
T 451

```

(SEQ ID NO:36)

11.6.1. Proteína de cadena pesada

```

GVVQPRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSCHKY 50
YADSVKGRFT ISRDNKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG AVVVPAAMDV 100
WQGGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV 150
S 151

```

(SEQ ID NO:10)

11.6.1. ADN de cadena kappa

```

ACCCAGTCTC CATCCTCCCT GTCTGCATCT GTAGGAGACA GAGTCACCAT 50
CACTTGCCCGG GCAAGTCAGA ACATTAGCAG GTATTTAAAT TGGTATCAAC 100
AGAAACCAGG GAAAGCCCCT AAGTTCCTGA TCTATGTTGC ATCTATTTTG 150
CAAAGTGGGG TCCCATCAGG GTTCAGTGCC AGTGGATCTG GGCCAGATTT 200
CACTCTNACC ATCAGCAGTC TGCAACCTGA AGATTTTGCA ACTTACTACT 250
GTCAACAGAG TTACAGTACC CCATTCACTT TCGGCCCTGG GACCAAAGTG 300
GATATCAAAC GAACTGTGGC TGCACCATCT GTCTTCATCT TCCCGCCATC 350
TGATGAGCAG TTGAAATCTG GAACTGCCTC TGTTGTGTGC CTGCTGAATA 400
AC 402

```

(SEQ ID NO:49)

11.6.1. Proteína de cadena kappa

```

TQSPSSLSAS VGDRVITICR ASQNISRYLN WYQQKPGKAP KFLIYVASIL 50
QSGVPSGFSA SGSGPDFTLT ISSLQPEDFA TYQCQSYST PFTFGPGTKV 100
DIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNN 134

```

(SEQ ID NO:23)

Figura 1K**11.7.1. ADN de cadena pesada**

```

GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CGTCTGGATT 50
CACCTTCAGT AGCNGTGGCA TGCACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGCAAGG 100
GGCTGGAGTG GGTGGCAGTT ATATGGTCTG ATGGAAGTCA TAAATACTAT 150
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA 200
CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT 250
ATTACTGTGC GAGAGGAACT ATGATAGTAG TGGGTACCCT TGACTIONGG 300
GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC 350
GGTCTTCCCC CTGGCGCCCT GCTCCAGGAG CACCTCCGAG AGCACAGCGG 400
CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCG 438

```

(SEQ ID NO:37)

11.7.1. Proteína de cadena pesada

```

VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SXGMHWVROA PGKGLEWVAV IWSDGSHKYY 50
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGT MIVVGTLDYW 100
QGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEP 146

```

(SEQ ID NO:11)

11.7.1. ADN de cadena kappa

```

ACCCAGTCTC CATCCTCCCT GTCTGCATCT GTAGGAGACA GAGTCACCAT 50
CACTTGCCGG GCAAGTCAGA GCATTTGCAA CTATTTAAAT TGGTATCAGC 100
AGAAACCAGG AAAAGCCCCT AGGGTCCTGA TCTATGCTGC ATCCAGTTTG 150
CAAGGTGGGG TCCCCTCAAG GTTCAGTGGC AGTGGATCTG GGACAGATTG 200
CACTCTCACC ATCAGCAGTC TGCAACCTGA AGATTTTGCA ACTTACTACT 250
GTCAACAGAG TTACACTACC CCATTCACCT TCGGCCCTGG GACCAGAGTG 300
GATATCGAAC GAACTGTGGC TGCACCATCT GTCTTCATCT TCCCGCCATC 350
TGATGAGCAG TTGAAATCTG GAACTGCCTC TGTTGTGTGC CTGCTGAATA 400
ACTTCTATCC CAGAGAGGCC AAAGTACAGT GGAAGGTGGA TAACGCCTAT 450
T 451

```

(SEQ ID NO:50)

11.7.1. Proteína de cadena kappa

```

TQSPSSLSAS VGDRVITICR ASQSICNYLN WYQOKPGKAP RVLIYAASSL 50
QGGVPSRFSG SSGIDCTLT ISSLQPEDFA TYQCQSYIT PFTFGPGTRV 100
DIERTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAY 150

```

(SEQ ID NO:24)

Figura 1L**12.3.1.1. ADN de cadena pesada**

TCCTGTGCAG CGTCTGGATT CACCTTCAGT TACTATGGCG

TCTGGGGGAG GCGTGGTCCA GCCTGGGAGG TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC 50
 AGCGTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATGG CGTGCACTGG GTCCGCCAGG 100
 CTCCAGGCAA GGGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATGGTA TGATGGAAGT 150
 AATAAATACT ATGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTACCA TCTCCAGAGA 200
 CAATTCCAAG AGCACGCTGT ATCTGCAAAT GAACAGCCTG AGAGCCGAGG 250
 ACACGGCTGT GTATTATTGT GCGAGAGACT CGTATTACGA TTTTTGGAGT 300
 GGTCGGGGCG GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC 350
 CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG CCCTGCTCCA 400
 GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC 450
 TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC TGACCAGCGG 500
 CGTGACACACC TTCCAGCTG TC 522

(SEQ ID NO:38)

12.3.1.1. Proteína de cadena kappa

SGGGVVQPGR SLRLSCAASG FTFSSYGVHW VRQAPGKGLE WVAWIYDGS 50
 NKYYADSVKG RFTISRDNK STLYLQMNLS RAEDTAVYYC ARDSYYDFWS 100
 GRGGMVWVWQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY 150
 FPEPVTVSWN SGALTSVHT FPAV 174

(SEQ ID NO:12)

12.3.1.1. ADN de cadena kappa

CCACTCTCCC TGCCCCTCAC CCTTGGACAG CCGGCCTCCA TCTCCTGCAG 50
 GTCTAGTCAA AGCCTCGTAT ACAGTGATGG AAACACCTAC TTGAATTGGT 100
 TTCAGCAGAG GCCAGGCCAA TCTCCAAGGC GCCTAATTTA TAAGGTTTCT 150
 AACTGGGACT CTGGGGTCCC AGACAGATTC AGCGGCAGTG GGTCAGGCAC 200
 TGATTTTACA CTGAAAATCA GCAGGGTGGG GGCTGAGGAT GTTGGGGTTT 250
 ATTACTGCAT GCAAGTTCA CACTGGCCTC CGACGTTCGG CCAAGGGACC 300
 AAGGTGAAA TCAAACGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT TCATCTTCCC 350
 GCCATCTGAT GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCTCTGTCT GTGTGCCTGC 400
 TGAATAACTT CTATCCCAC 419

(SEQ ID NO:51)

12.3.1.1. Proteína de cadena pesada

PLSLPVTLGQ PASISCRSSQ SLVYSDGNTY LNWFQQRPGQ SPRRLIYKVS 50
 NWDSGVPDRF SSGSGTDFT LKISRVEAED VGVYYCMQGS HWPPTFGQGT 100
 KVEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYF 139

(SEQ ID NO:25)

Figura 1K**12.3.1.1. ADN de cadena pesada**

```

GTCCAGCCTG GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTCAC 50
CTTCAGTAAC TATGCCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC 100
TGGAGTGGGT GGTAGTTATT TGGCATGATG GAAATAATAA ATACTATGCA 150
GAGTCCGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC 200
GCTGTATCTG CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTATATT 250
ACTGTGCGAG AGATCAGGGC ACTGGCTGGT ACGGAGGCTT TGACTIONCTGG 300
GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC 350
GGTCTTCCCC CTGGCGCCCT GCTCCAGGAG CACCTCCGAG AGCACAGCGG 400
CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG 450
TGGAACTCAG GCGCTCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC 490

```

(SEQ ID NO:39)

12.9.1.1. Proteína de cadena pesada

```

VQPGRSLRLS CAASGFTFSN YAMHWVRQAP GKGLEWVVVI WHDGNNKYIA 50
ESVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARDQG TGWYGGFDWF 100
GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 150
WNSGALTSKV HTF 163

```

(SEQ ID NO:13)

12.9.1.1. ADN de cadena kappa

```

CCTGGAGAGC CGGCTTCCAT CTCTTGCAGG TCTAGTCAGA GCCTCCTGCA 50
TAGTAATGGA TACAACATTT TGGATTGGTA CCTGCAGAAG CCAGGACAGT 100
CTCCACAGCT CCTGATCTAT TTGGGTCTTA ATCGGGCCTC CGGGGTCCCT 150
GACAGETTCA GTGGCAGTGG ATCAGGCACA GATTTTACAC TGAAACTCAG 200
CAGAGTGGAG GCTGAGGATG TTGGGGTTTA TTACTGCATG CAAGCTCTAC 250
AAACTCCTCT CACTTTCGGC GGAGGGACCA AGGTGGAGAT CAAACGAACT 300
GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA 350
ATCTGGAAGT GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAR 400
AGGCCAAAGT ACATTCCAT 419

```

(SEQ ID NO:52)

12.9.1.1. Proteína de cadena kappa

```

PGEPASISCR SSQSLLHSNG YNYLDWYLQK PGQSPQLLIY LGSNRASGVP 50
DRFSGSGSGT DFTLKLRSVE AEDVGVYYCM QALQTPITFG GGTKVEIKRT 100
VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPR 133

```

(SEQ ID NO:26)

Figura 2

CDR	DP5 0	3.1.1	4.1.1	4.8.1	4.10. 2	4.13. 1	4.14. 3	6.1.1	11.2. 1	11.6. 1	11.7. 1	12.3. 1.1	12.9. 1.1
								G					
	G	G	G	G	G			G	G	G		G	
	V	V	V	V	V			V	V	V	V	V	
	V	V	V	V	V			V	V	V	V	V	V
	Q	Q	Q	Q	Q			E	Q	Q	Q	Q	Q
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	A	A	V	T	V	A	A	T	A	A	A	A	A
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	T	T	T	T	I	T	T	T	T	T	T	T	T
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
CDR 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	N
	Y	Y	H	Y	H	H	H	Y	Y	Y	C	Y	Y
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
	M	M	M	M	I	I	I	M	M	M	M	V	M
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	S	Y	H
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
CDR	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	N

Figura 2 (continuación)

CDR	DP5 0	3.1.1	4.1.1	4.8.1	4.10. 2	4.13. 1	4.14. 3	6.1.1	11.2. 1	11.6. 1	11.7. 1	12.3. 1.1	12.9. 1.1
2													
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	H	H	N	N
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	Y	Y	Y	H	D	D	D	H	Y	Y	Y	Y	Y
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	E
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	V	V	V	V	V	V	V	A	V	V	V	V	V
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	N	N	N	N	N	N	K	N	N	N	N	S	N
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	Y	Y	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
		G	G	G	V	V	V	A	D	G	G	D	D
		A	G	E	A	A	A	G	P	A	T	S	Q
		R	H	R	P	P	P	L	R	V	M	Y	G
		I	F	L	L	L	L	L	G	V	I	Y	T
CDR 3		I	G	G	G	G	G	G	A	V	V	D	G

Figura 2 (continuación)

CDR	DP5 0	3.1.1	4.1.1	4.8.1	4.10. 2	4.13. 1	4.14. 3	6.1.1	11.2. 1	11.6. 1	11.7. 1	12.3. 1.1	12.9. 1.1
		T	P	S	P	P	P	Y	T	P	V	F	W
		P	F	Y	L	L	L	F	L	A	G	W	Y
		C	D	F	D	D	D	D	Y	A	T	S	G
		M	Y	D	Y	Y	Y	Y	Y	M	L	G	G
		D	W	Y	W	W	W	W	Y	D	D	R	F
		V	G	W	G	G	G	G	Y	V	Y	G	D
		W	Q	G	Q	Q	Q	Q	Y	W	W	G	F
		G	G	Q	G	G	G	G	G	G	G	M	W
		Q	T	G	T	T	T	T	M	Q	Q	D	G
		G	L	T	L	L	L	L	D	G	G	V	Q
		T	V	L	V	V	V	V	V	T	T	W	G
		T	T	V	T	T	T	T	W	T	L	G	T
		V	V	T	V	V	V	V	G	V	V	Q	L
		T	S	V	S	S	S	S	Q	T	T	G	V
		V	S	S	S	S	S	S	G	V	V	T	T
		S	A	S	A	A	A	A	T	S	S	T	V
		S	S	A	S	S	S	S	T	S	S	V	S
		A	T	S	T	T	T	T	V	A	A	T	S
		S	K	T	K	K	K	K	T	S	S	V	A
		T	G	K	G	G	G	G	V	T	T	S	S
		K	P	G	P	P	P	P	S	K	K	S	T
		G	S	P	S	S	S	S	S	G	G	A	K
		P	V	S	V	V	V	V	A	P	P	S	G
		S	F	V	F	F	F	F	S	S	S	T	P
		V	P	F	P	P	P	P	T	V	V	K	S
		F	L	P	L	L	L	L	K	F	F	G	V
		P	A	L	A	A	A	A	G	P	P	P	F
		L	P	A	P	P	P	P	P	L	L	S	P
		A	C	P	C	C	C	C	S	A	A	V	L
		P	S	C	S	S	S	S	V	P	P	F	A
		C	R	S	R	R	R	R	F	C	C	P	P
		S	S	R	S	S	S	S	P	S	S	L	C
		R	T	S	T	T	T	T	L	R	R	A	S
		S	S	T	S	S	S	S	A	S	S	P	R
		T	E	S	E	E	E	E	P	T	T	C	S
		S	S	E	S	S	S	S	C	S	S	S	T
		E	T	S	T	T	T	T	S	E	E	R	S
		S	A	T	A	A	A	A	R	S	S	S	E
		T	A	A	A	A	A	A	S	T	T	T	S
		A	L	A	L	L	L	L	T	A	A	S	T
		A	G	L	G	G	G	G	S	A	A	E	A
		L	C	G	C	C	C	C	E	L	L	S	A
		G	L	C	L	L	L	L	S	G	G	T	L
		C	V	L	V	V	V	V	T	C	C	A	G
		L	K	V	K	K	K	K	A	L	L	A	C
		V	D	K	D	D	D	D	A	V	V	L	L
		K	Y	D	Y	Y	Y	Y	L	K	K	G	V
		D	F	Y	F	F	F	F	G	D	D	C	K

Figura 2 (continuación)

CDR	DP5 0	3.1.1	4.1.1	4.8.1	4.10. 2	4.13. 1	4.14. 3	6.1.1	11.2. 1	11.6. 1	11.7. 1	12.3. 1.1	12.9. 1.1
		Y	P	F	P	P	P		C	Y	Y	L	D
		F	E	P	E	E	E		L	F	F	V	Y
		P	P	E	P	P	P		V	P	P	K	F
		E	V	P	V	V	V		K	E	E	D	P
		P	T	V	T	T	T		D	P	P	Y	E
		V	V	T	V	V	V		Y	V		F	P
		T	S	V	S	S	S		F	T		P	V
		V	W	S	W	W	W		P	V		E	T
		S	N	W	N	N	N		E			P	V
		W	S	N	S	S	S		P			V	S
		N	G	S	G	G	G		V			T	W
		S	A	G	A	A	A		T			V	N
		G	L	A	L	L	L		V			S	S
		A	T	L	T	T	T		S			W	G
		L	S	T	S	S	S		W			N	A
		T	G	S	G		G		N			S	L
		S	V	G	V		V		S			G	T
		G	H	V	H		H		G			A	S
		V	T	H	T		T		A			L	G
		H	F	T	F		F		L			T	V
		T	P	F	P		P		T			S	H
		F	A	P	A		A		S			G	T
		P	V	A	V		V		G			V	F
		A	L	V	L		L		V			H	
		V	Q		Q		Q		H			T	
		L										F	
		Q										P	
												A	
												V	

Figura 3

Producto génico DP-65 o 4-31

VSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSGSIYYNPSLKSRTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
CDR2

Peoteína de cadena pesada 2.1.3

SGPGLVKPSQILSLTCTVSGGSISSGGHYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYIGNIYYNPSLKSRTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
CDR1
DSGDYYGIDYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPCSRTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
CDR3

Figura 4**Producto génico DP-65 o 4-31**

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSYSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAIGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCOOYGSSP
 CDR1 CDR2 CDR3

Proteína de cadena kappa 4.1.1

QSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLA WYQQRPQQAPRLLIYGASSRAIGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCOOYGISLPT
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK

Proteína de cadena kappa 4.8.1

QSPGTLSPGERATLSCRISWVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAIGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCOOYGISLPT
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

Proteína de cadena kappa 4.14.3

GTLSPGERATLSCRASQSYSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAIGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCOOYGRSPEI
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

Proteína de cadena kappa 6.1.1

QSPGTLSPGERATLSCRASQSYSSSYLA WYQQKPGQAPRLIYGSSRAIGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCOOYGISLPT
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

Proteína de cadena kappa 4.10.2

SPGTLSPGERATLSCRASQSISSNFLA WYQQKPGQAPRLLIYRESRAIGIPDSFSGSGGTDFLTISRLEPEDFALYYCOOYGISLPT
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

Proteína de cadena kappa 4.13.1

QSPGTLSPGERATLSCRASQSYSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAIGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCOOYGRSPEI
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKGG

Figura 5

Producto génico 012

DIQMTQSPSSLSASVGDRAVITTCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQSYSTP
 CDR1 CDR2 CDR3

Proteína de cadena kappa 3.1.1

QSPSSLSASVGDRAVITTCRASQSIINTYLLWYQQKPKAPNFIISAISILQSGVPSRFRSGSGTINFILTINSLHPEDFATYYCQQSYSTP
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

Proteína de cadena kappa 11.2.1

PSSLSASVGDRAVITTCRASQSIINSYLLD^{WYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQXYSTP}
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

Proteína de cadena kappa 11.6.1

TQSPSSLSASVGDRAVITTCRASQSIKRYLLN^{WYQQKPKAPKFLIYASILQSGVPSGFASGSGPDFLTITSSLPEDFATYYCQQSYSTP}
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQKSGTASVVCLLNN

Proteína de cadena kappa 11.7.1

TQSPSSLSASVGDRAVITTCRASQSI^{CNYLLN^{WYQQKPKAPRVL}IYAASSLQGGVPSRFRSGSGIDCILTISSLPEDFATYYCQQSYSTP}
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTRVDIERTVAAPSVFIFPPSDEQKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAY

Figura 6

Producto génico A10/A26

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSEGVPSRFSGSGTDFILTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPQ
CDR1 CDR2 CDR3

Proteína de cadena kappa 2.1.3

SPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSEGVPSRFSGSGTDFILTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPLT
CDR1 CDR2 CDR3
FGGGTKVEIKRIVAAPSVFIFPPSIDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE

Figura 7

Producto génico A17

DVVMTQSP^{CDRI}LSLPVILGQPASISCRSSQSLVYSIDGNIYLNWFQQRPQSPRRLLIKYSNRDSGVPDRFSGSGGTDFILKISRVEAEDVGVYYCMQGHWF^{CDR3}

Proteína de cadena kappa 12.3.1

PLSLPVTILGQPASISCRSSQSLVYSIDGNIYLNWFQQRI^{CDRI}GQSPRRLLIKYSNWDGVPDRFSGSGGTDFILKISRVEAEDVGVYYCMQGS^{CDR2}HWF^{CDR3}
 FGQGTKVEIKRIVAA^{CDRI}PSVFIFPSDEQLKSGTASVVCLLN^{CDR2}FYP

Figura 8

Producto génico A3/A19

DIVMTQSP¹LSLPVITGEPASISCRSSQSL²HSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG³SNRASGV⁴PDFRFSGSGSDFTILKISRVEAEDVGVYYCMQALQI⁵LP
CDR1 CDR2 CDR3

Proteína de cadena kappa 12.9.1

PGEPASISCRSSQSL²HSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG³SNRASGV⁴PDFRFSGSGSDFTILKISRVEAEDVGVYYCMQALQI⁵PLI
CDR1 CDR2 CDR3
FGG⁶GTKVEIKRTVAAPSVFIF⁷PPSDEQLKSGTASVVCLLNNF⁸YPR

Figura 9 Análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal

Hibridoma	Cadena ligera	MW
CT2.1.3	ND	ND
CT3.1.1	NH ₂ -DIQMTQSPSSLSASVGDRV	26,119
CT4.1.1	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23,917
CT4.8.1	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23,617
CT4.9.1	NH ₂ -DIQMTQSPSSVSASVGDRV	23,702
CT4.10.2	NH ₂ -TGEFVLTQSPGTLSPGER (60%) NH ₂ -EFVLTQSPGTLSPGERAT (40%)	24,101
CT4.14.3	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23,770
CT4.13.1	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23,802
CT6.1.1	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23,747

Hibridoma	Cadena pesada	MW
CT2.1.3	ND	ND
CT3.1.1	NH ₂ -Bloqueado. Después de tratamiento con Piroglutamato Aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (seq mayoritaria~80%) NH ₂ -PEVQF... (seq minoritaria~20%)	51,813
CT4.1.1	NH ₂ -Bloqueado. Después de tratamiento con Piroglutamato Aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (seq mayoritaria~65%) NH ₂ -PEVQFNWYVD... (seq minoritaria~35%)	51,502
CT4.8.1	NH ₂ -Bloqueado. Después de tratamiento con Piroglutamato Aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPG(R)SL... (seq mayoritaria~60%) NH ₂ -PEVQFNWY... (seq minoritaria~40%)	51,597
CT4.9.1	NH ₂ -EVQLLESGGGLVQPGGSLRL (free amino terminus)	51,437
CT4.10.2	NH ₂ -Bloqueado. Después de tratamiento con Piroglutamato Aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (seq mayoritaria~60%) NH ₂ -PEVQFNWYVD... (seq minoritaria~40%)	51,502
CT4.14.3	NH ₂ -Bloqueado. Después de tratamiento con Piroglutamato Aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSL(R)(L)(S) (seq mayoritaria~65%) NH ₂ -PEVQFNWYV... (seq minoritaria~35%)	51,293
CT4.13.1	NH ₂ -Bloqueado. Después de tratamiento con Piroglutamato Aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (seq mayoritaria~75%) NH ₂ -PEVQFN... (seq minoritaria~25%)	51,305
CT6.1.1	NH ₂ -Bloqueado. Después de tratamiento con Piroglutamato Aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVEPGRSLRLS* (seq mayoritaria~65%) NH ₂ -PEVQFNWYVD... (seq minoritaria~35%)	51,476

*Esta secuencia de cadena pesada es similar a las demás secuencias de cadenas pesadas bloqueadas excepto un cambio único Gln ->Glu en posición 13.

Figura 10A

anticuerpo	Conc. (ng/ml) (Ec1.58)		IEF observado	SDS-PAGE		SEC observado	reportado MALDI		n-term. seq. (lc)*	
	reportado	observado		(+) b-me	(-) b-me		Hc	Lc	reportado	observado
CT 3.1.1	1.1	1.57	mancha	50 & 28 kDa	6 bandas	139,400	51,813	26,119	DIQMTQSP	DIQMTQSP
CT 4.1.1	1.54	1.65	mancha	50 & 24 kDa	6 bandas	79,900	51,502	23,917	EIVLTQSP	EIVLTQSP
CT 4.8.1	1.52	1.54	4 bandas	50 & 24 kDa	6 bandas	110,300	51,597	23,617	EIVLTQSP	EIVLTQSP
CT 4.10.2	1.29	1.77	4 bandas	50 & 25 kDa	6 bandas	107,200	51,502	24,101	**	***
CT 4.14.3	1.75	1.65	mancha	50 & 24 kDa	6 bandas	82,800	51,293	23,770	EIVLTQSP	EIVLTQSP
CT 6.1.1	1.36	1.3	4 bandas	50 & 24 kDa	6 bandas	101,100	51,476	23,747	EIVLTQSP	EIVLTQSP

* todas las cadenas pesadas bloqueadas en su extremo N (no secuenciadas internamente)
 ** secuencia mixta reportada: TGEFVLTQSP (60) & EFVLTQSP (40)
 *** secuencia mixta observada: TGEFVLTQSP (60) & EFVLTQSP (40)

IOD_{280nm} = 0.633 ng/ml
 Ec=1.58

Figura 10D

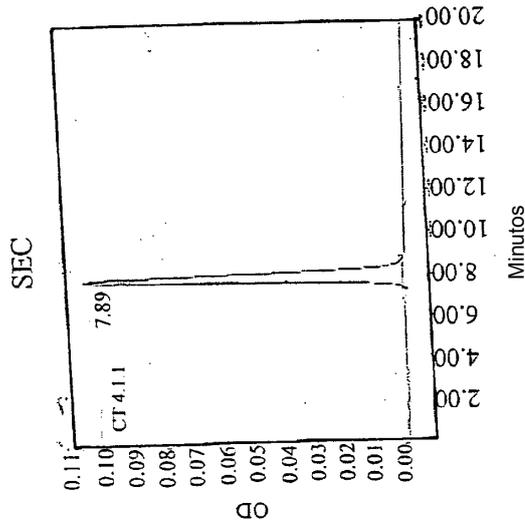


Figura 10C

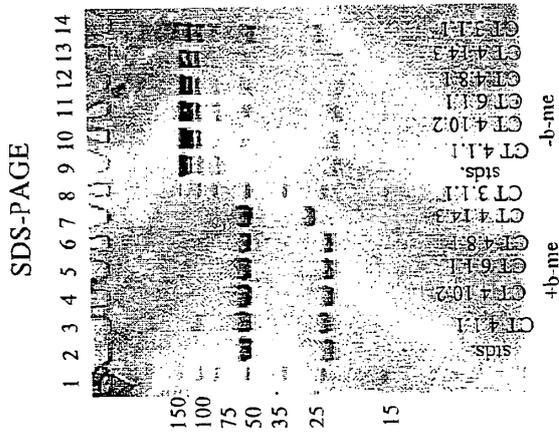


Figura 10B

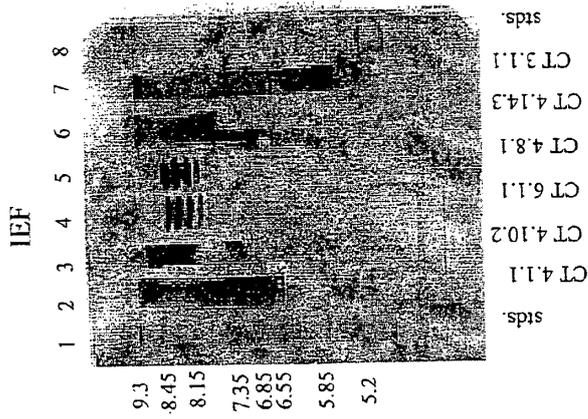
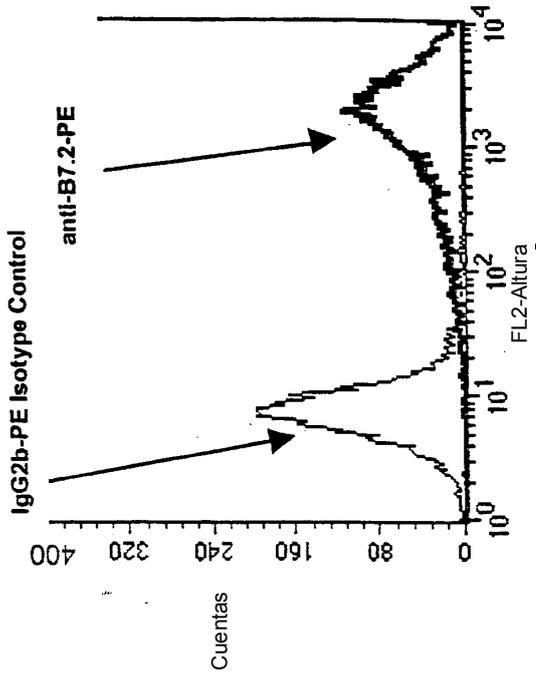
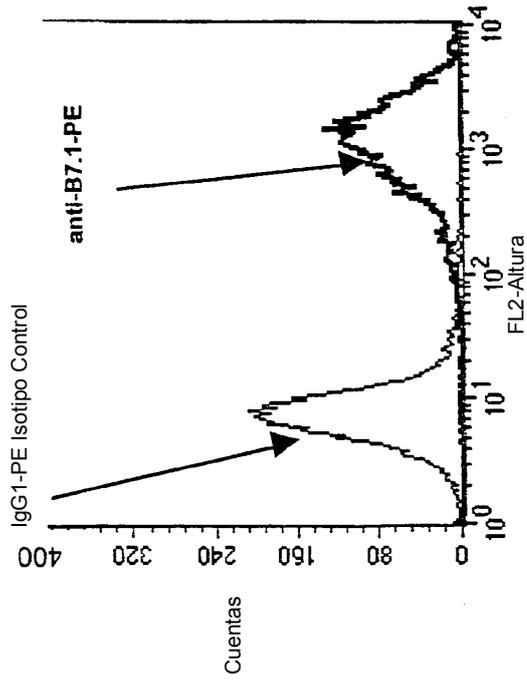


Figura 11B



99.7% B7.2 pos.

Figura 11A



99.7% B7.1 pos.

Expresión de B7.1 y B7.2 sobre células Raji

Figura 12

Mejora de la producción de IL-2 en Células T humanas inducida por MAbs anti-CTLA4 de xeno-ratón en el ensayo blastos T / Raji de 72 horas

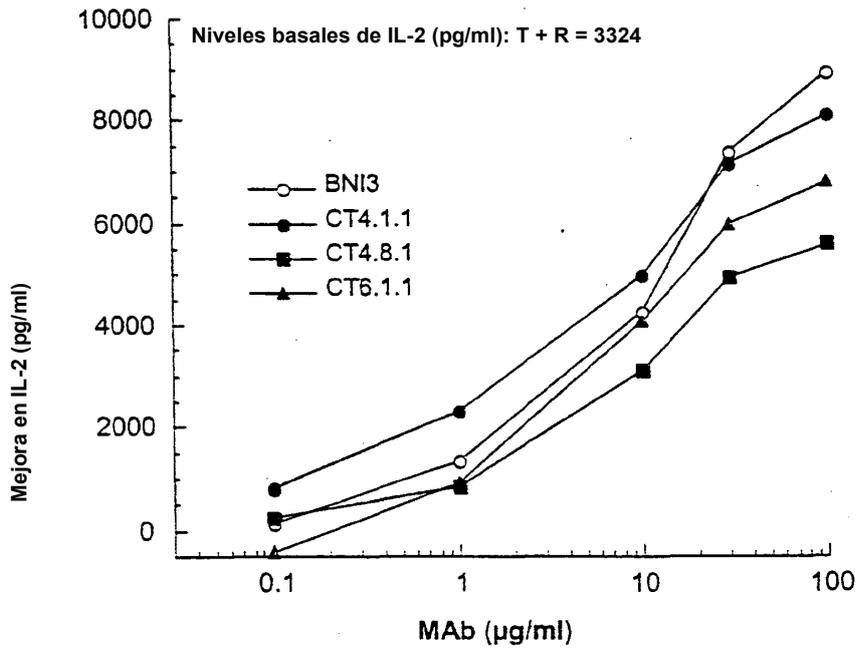


Figura 13

Mejora de la producción de IFN- γ en Células T humanas inducida por MAbs anti-CTLA4 de xeno-ratón en el ensayo blastos T / Raji de 72 horas

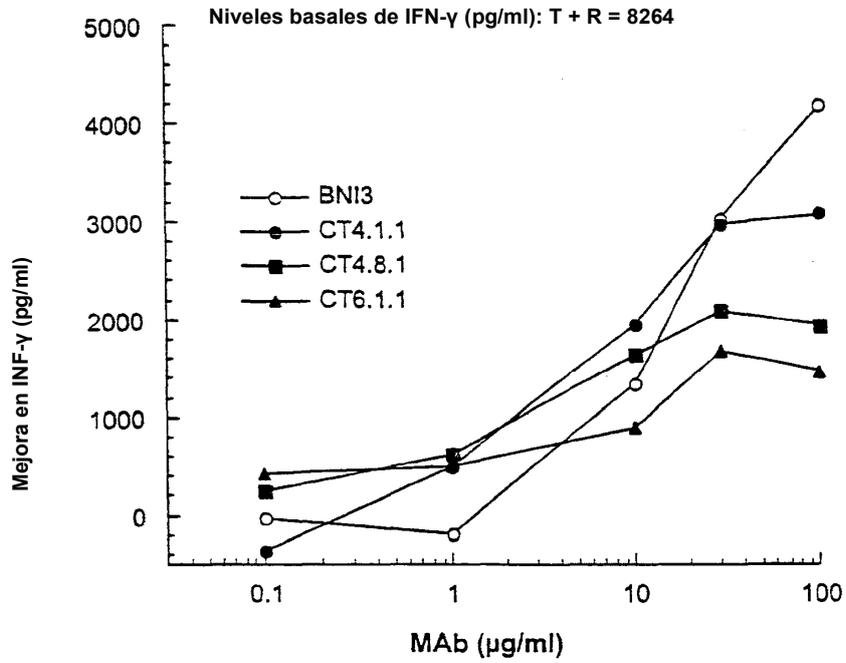


Figura 14

Mejora de la producción de IL-2 en Células T humanas inducida por MAbs anti-CTLA4 de xeno-ratón en el ensayo blastos T / Raji de 72 horas (6 donantes)

[Niveles basales de IL-2 (pg/ml): T + R = 9187, T + R + IgG2a = 9389, T + R + IgG2 = 8509

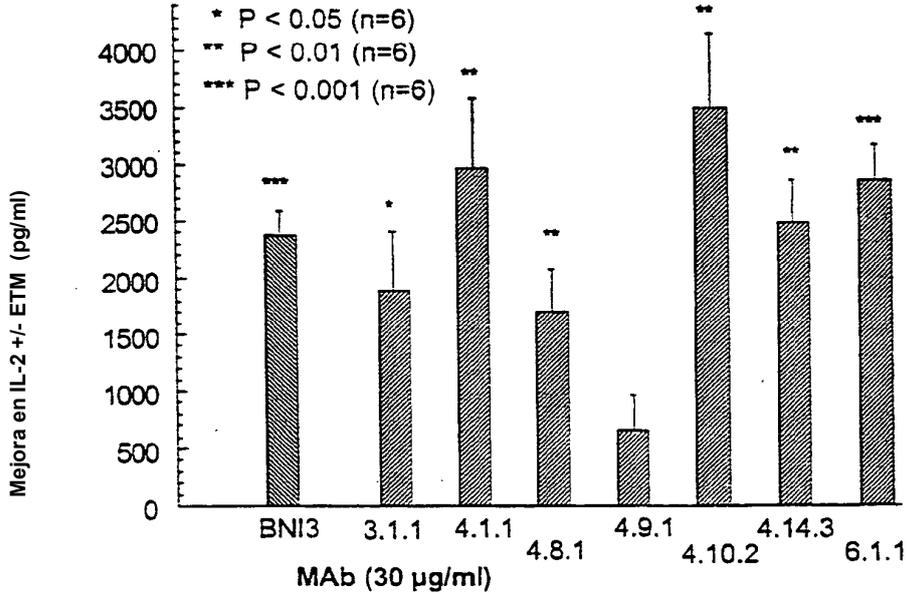


Figura 15

Mejora de la producción de IFN- γ en Células T humanas inducida por
MAbs anti-CTLA4 de xeno-ratón en el ensayo blastos T / Raji de 72
horas (6 donantes)

Niveles basales de IFN- γ (pg/ml): T + R = 4780, T + R + IgG2a = 4868, T + R + IgG2 = 4331

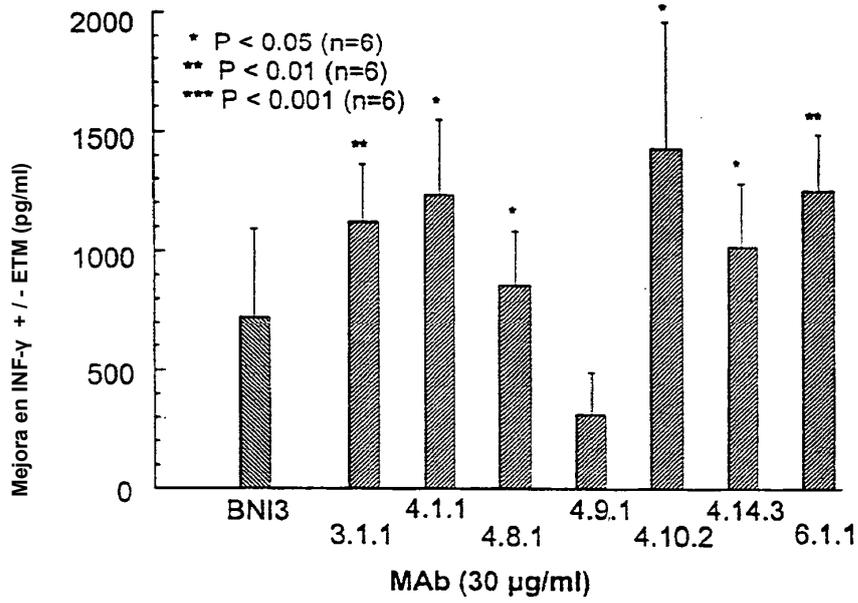


Figura 16

Mejora de la producción de IL-2 inducida por MAb anti-CTLA4 CT4.1.1 (30 µg/ml) que se unen a PBMC humanos estimulados con SEA (100 ng/ml) + MAb Anti-CD3 (60 ng/ml)

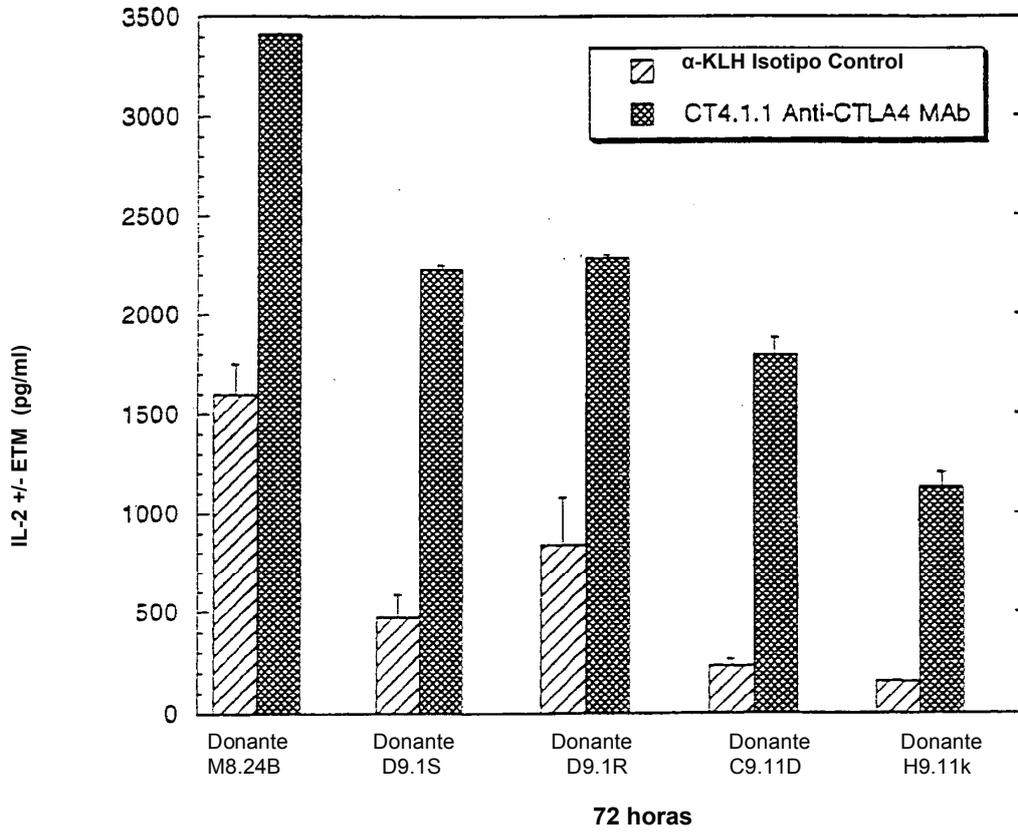


Figura 17

Mejora de la producción de IL-2 inducida por MAbs anti-CTLA4 (30 µg/ml) en Sangre Completa Humana estimulada con SEA (100 ng/ml) + MAb Anti-CD3 (60 ng/ml)

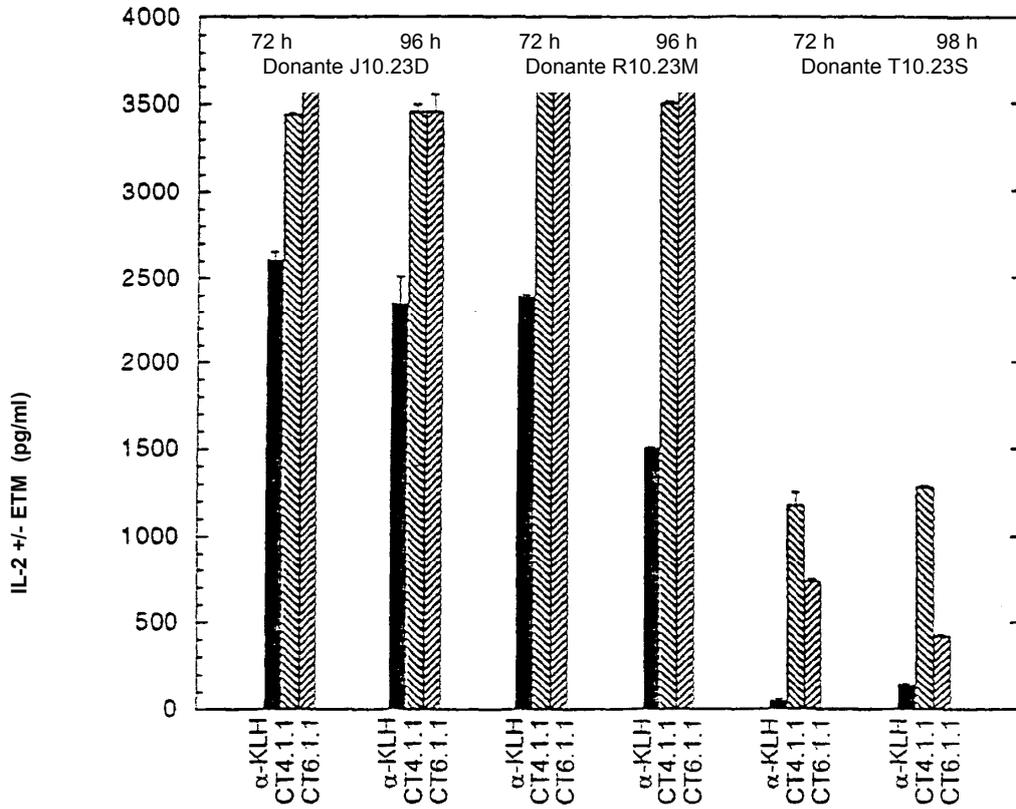
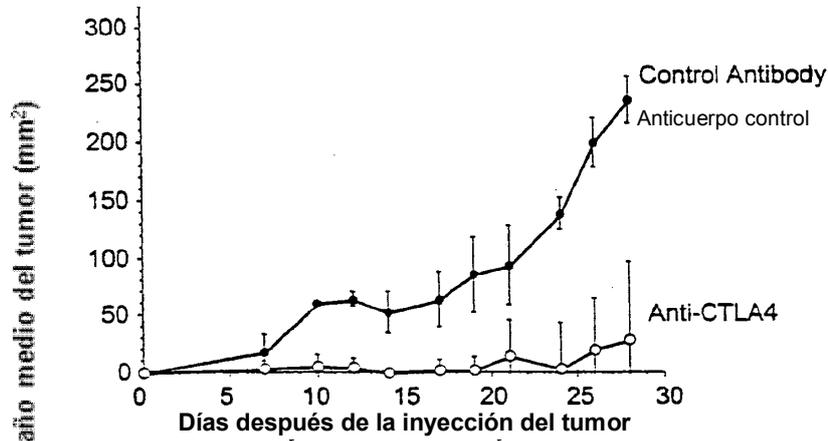


Figura 18

Anti-Murine CTLA4 Inhibits Tumor Growth in Mice

Anti-CTLA4 murino inhibe crecimiento tumoral en ratones



El tratamiento se administró los días 0, 4, 7 y 14 después de la provocación con el tumor

Figura 19

Mejora de la producción de IL-2 inducida por MAb anti-CTLA4 (30 µg/ml) en los ensayos con Superantígeno y con Blastos T / Raji en 72 h

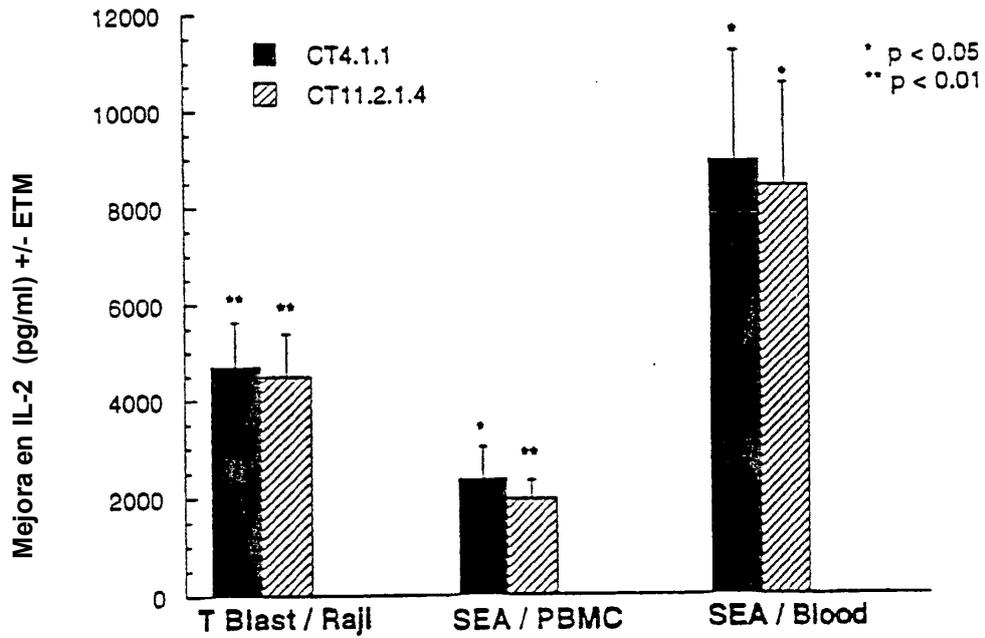


Figura 20

Mejora de la producción de IL-2 de Células T humanas inducida por MAbs anti-CTLA4 (30 µg/ml) en los ensayo con Blastos T / Raji en 72 h

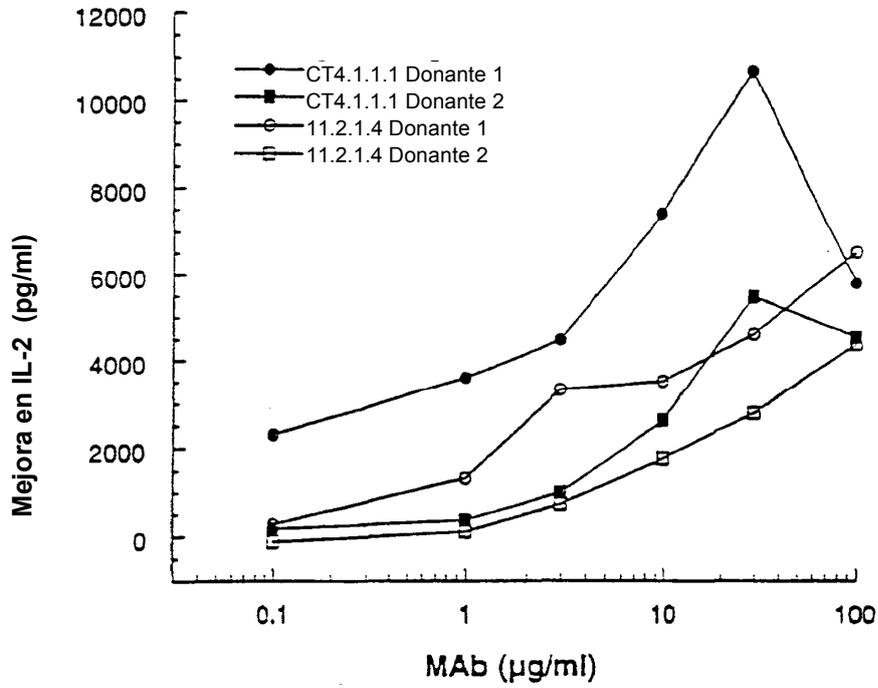
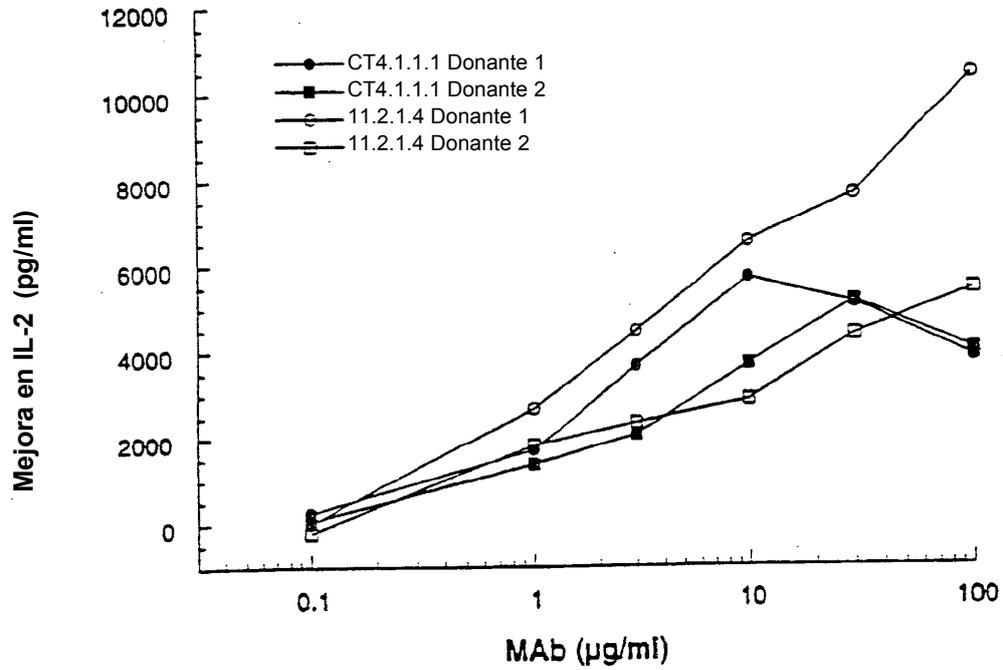


Figura 21

Mejora de la producción de IL-2 inducida por MAbs anti-CTLA4 en sangre completa estimulada con Superantígeno (100 ng/ml)



- Péptidos señal mostrados en negrilla y texto grande
- Marco de lectura abierto para clon genómico subrayado
- Mutaciones introducidas para hacer Ab (N294O) desglucosilados subrayado doble y texto grande

Figura 22A 4.1.1 ADNc de cadena pesada de IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGSTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC
CATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACCT
CGGTCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAG
CTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCAC
CGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACG
TTCCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO:53)

Figura 22B 4.1.1 ADN genómico de cadena pesada de IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTCAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCCITCAGTAGC
CATGGGATGCACTGGGTCCGGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGGTGGAGTGGGTGGC
AGTTATAAGGTATGATGGAAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTTCTGCAAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGAACAAGGCTGTGTATATACTGTCCGACAGGAGGTCACTT
CGGTCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCCCTGCTCAAGCTCTCCTCAGCTA
GCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGCAACCGGT
GACGGTTCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAACCTTCCCAG
CTGTCCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGGCC
TCCAGCAACTTCGGCACCCACACTACCTGCAACGTAATCAACAAGCCGAG
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGGTGAGAGGCCAGCTCAGGGAGGGAGGG
TGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGC
AGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGC
CTCTGCCGCCCACTCACTGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTTCCACCA
GGCTCCAGGCAGGCACAGGCTGGGTGCCCTACCCAGGCCCTTCAACACAG
GGGCAGGTGCTTGGCTCAGACCTGCCAAAAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCC
CCTGACCTAAGCCGACCCCAAGGCCAAACTGTCCACTCCCTCAGCTCGGACA
CCTTCTCTCCTCCAGATCCGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCGCA
AATGTTGTGTGAGTGCCTCCAGTCCGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCC
TCCAGCTCAAGCCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC
CCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCACTGTG
GCAGGACCGTCACTCTCCTCTTCCCCCAAAACCCAGGACACCCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCACCGGAGGAGCAGTTCAACAGCAAGTTCCTGTGCTCAGCCTCCT
CACCGTTGTGCCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCT
CCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCCGAGAAACCATCTCCAAAACCAAGGT
GGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCT
CTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCCGACATCCCGCTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCCACCTCCCATG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGCAAGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ
 ID NO: 54)

Figura 22C 4.1.1 Proteína de cadena pesada de IgG2

MEFGLSWVFLVALLRQVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSS
HGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGRNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMN
SLRAEDTAVYYCARGGHFGPFDYWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVRKKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF
PSRERMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALFNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 63)

Figura 22D 4.1.1 ADNc N2940 de cadena pesada de IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
 GTGTCCAGTGTTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
 CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC
 CATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
 AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
 GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC
 AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACTT
 CGGTCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCT
 CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
 GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
 GACGGTGTGCTGGAAGTCCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAG
 CTGTCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
 TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
 CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGGCCAC
 CGTGCCCGAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAA
 CCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGT
 GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTCAACTGGTACGTGGACGGCG
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTC~~CC~~AAGCACG
 TTCCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
 GGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGSCCTCCCAGCCCCATCGASAAAA
 CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
 CCATCCCCGGGAGAGATCACCAAGAACCAGGTGACCGTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
 AGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTCGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
 TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:55)

Figura 22E 4.1.1 Proteína N2940 de cadena pesada de IgG2

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPRSLRLSCVASGFTFSS
 HGMHWVRQAPGKLEWVAWIWYDGRNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMN
 SLRAEDTAVYYCARGGHGFPFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVPLAPCSRSTS
 ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
 PKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQST
 FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF
 PSREBMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 64)

Figura 22F 4.1.1 ADN de cadena kappa

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC
CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGC
AGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT
CATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCA
GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGAT
TTTGCACTGTATTACTGTGACAGTATGGTACCTCACCCTGGACGTTCCGGCCA
AGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT
TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTAC
AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO:56)

Figura 22G 4.1.1 Proteína de cadena kappa

METPAQLLFLLLLWLPDTTTGEIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQIS
SSFLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPED
FAVYYCQYGTSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPRFAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLLSKADYEK
HKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:65)

Figura 22H 4.8.1 ADN de cadena pesada

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAAGAG
GTGTCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAAC
TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAACACTATGGAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGAGACT
GGGGTCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCTCTCCTCAG
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC
TCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
GGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAACTTCCGCCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA CAAGCC
CAGCAACACCAAGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCC
CACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGT
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC
ACGTTCCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:57)

Figura 22I 4.8.1 Proteína de cadena pesada

MEFGLSWVFLVALLRQVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSN
 YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKHYGDSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMN
 SLRAEDTAVYYCARGERLGSYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
 SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPP
 KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
 TFRVVSVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 66)

Figura 22J 4.8.1 ADN de cadena kappa

ATGGAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC
 CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT
 TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTGTTAGCAGCAGT
 TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA
 TGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT
 CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA
 GTCTATTACTGTCAGCAGTATGGCATCTCACCCCTTCACTTTCGGCGGAGGGAC
 CAAGGTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC
 CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCA
 ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
 ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
 GTCTACGCCTGCCAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAGAG
 CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 58)

Figura 22K 4.8.1 Proteína de cadena kappa

METPAQLLFLLLLWLDPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRTSVSSS
 YLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTI SRLEPEDFA
 VYYCQQYGI SPFTFGGCTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 67)

Figura 22L 6.1.1 ADN de cadena pesada

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTTCGAGC
 CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGT
 TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
 AGTTATATGGTATGATGGAAGCAATAAACACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCC
 GATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC
 AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGGACTGCT
 GGGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCT
 CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
 GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
 GACGGTGTCTGGAAGTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAG
 CTGTCCTTACGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
 TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
 CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCAC
 CGTGCCCGAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAA
 CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGT
 GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAG
 TTCCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
 GGAGTACAAGTCAAGTCTCCAACAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
 CCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGCTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
 AGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
 TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:59)

Figura 22M 6.1.1 Proteína de cadena pesada

MEFGLSWVFLVALLRQVQCVQQLVESGGGVVEPGRSLRLSCTASGFTFSS
 YGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDGSKHYADSAKGRFTISRDNKNTLYLQMN
 SLRAEDTAVYYCARAGLLGYFDYWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
 ESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPK
 PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 FRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLF
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMQLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 68)

Figura 22N 6.1.1 ADN de cadena kappa

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC
 CAGATAACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCA CCTGTCTT
 TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAAAGTETTAGC
 AGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCCCTCAT
 CTATGGTGTATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTG
 GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT
 GCAGTGTATTACTGTGACGAGTATGGTATCTCACCATTCACTTTTCGGCCCTGG
 GACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
 CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
 AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCT
 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA
 CCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
 AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
 GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO:60)

Figura 22O 6.1.1 Proteína de cadena kappa

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVS
 SYLAWYQQKPGQAPRPLIYGVSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDF
 AVYYCQQYGISPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSTLTLSKADYEKH
 KVIYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:69)

Figura 22P 11.2.1 ADN de cadena pesada de IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAAGAG
 GTGTCCAGTGTGAGGTGACGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGC
 CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGACGCTCTGGATTACCTTCAGTAGC
 TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
 AGTTATATGSTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
 GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC
 AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGAGGGG
 AGCTACCCCTTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCA
 CGGTACCCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG
 CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGCTCAA
 GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCTTGACCA
 GCGGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTG
 CAACGTAGATCAACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCA
 AATGTTGTGTGAGTGGCCACCGTGGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCA
 GTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC
 TGAGGTACCGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGT
 TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGG
 GAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCTTGTGCA
 CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAATGGGCGAGCCGGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG
 GTGGCAGCAGGGGAACGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID
 NO:61)

Figura 22Q 11.2.1 Proteína de cadena pesada de IgG2

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY
 DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLY
 YYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH
 KPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC
 VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTIVVHQDWL
 NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:70)

Figura 22R 11.2.1 ADN de cadena kappa de IgG2

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCT
 GGCTCCGAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC
 CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAG
 CATTAAACAGCTATTTAGATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAC
 TCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT
 GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA
 AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGTATTACAGTACTCCATTCACTTTG
 GCCCTGGGACCAAAGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
 ATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTG
 CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATA
 ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
 GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA
 GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG
 TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGTGA (SEQ ID NO:62)

Figura 22S 11.2.1 Proteína de cadena kappa de IgG2

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPKAPKLLIYAASS
 LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEI
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC (SEQ ID NO:71)