

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 526**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2015 PCT/IB2015/051786**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136469**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2015 E 15712429 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3116911**

54 Título: **Anticuerpos anti-MCAM y métodos de uso asociados**

30 Prioridad:

12.03.2014 US 201461952123 P

11.07.2014 US 201462023698 P

24.10.2014 US 201462068438 P

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

25.02.2020

73 Titular/es:

**PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
77 Sir Rogerson's Quay, Block C, Grand Canal
Docklands
Dublin 2, D02 T804, IE**

72 Inventor/es:

LIU, YUE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 744 526 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 anti-MCAM y métodos de uso asociados

Referencias cruzadas a las solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. Nº 61/952.123, presentada el 12 de marzo de 2014, la Solicitud Provisional de EE. UU. Nº 62/023.698, presentada el 11 de julio de 2014 y la Solicitud Provisional de EE. UU. Nº 62/068.438, presentada el 24 de octubre de 2014.

Referencia a un listado de secuencias, una tabla, o una lista de programas informáticos

El Listado de Secuencias escrito en el archivo 459014SEQLIST.txt, creado el 4 de marzo de 2015, para "ANTICUERPOS ANTI-MCAM Y MÉTODOS DE USO ASOCIADOS" tiene 148 kilobytes.

10 Antecedentes

15 Un subconjunto de células T CD4+, denominadas células TH17 (células T auxiliares 17), se ha implicado en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes, en particular las afecciones neuroinflamatorias que involucran la infiltración en el SNC de células T, como la esclerosis múltiple y el modelo animal, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Se ha informado que las células TH17 secretan una serie de citocinas seleccionadas que incluyen IL-17 e IL-22. Se ha informado que las células TH17 experimentan un reclutamiento específico e infiltración del tejido. Se ha informado que MCAM se expresa en las células TH17 y se une a laminina alfa-4 como ligando.

Flanagan, et al. (2012) PLoS ONE 7 (7): e40443 y el documento WO 2012/170071 A1 informan de la unión de MCAM humana a laminina alfa 4 y proporcionan el clon 17 como anticuerpo que se une a MCAM humana e inhibe su interacción con laminina alfa 4.

20 Zhang et al. (2008) Hybridoma 27 (5): 345-352 analiza varios anticuerpos contra la MCAM humana, ninguno de los cuales se describe como inhibidor de la interacción entre la MCAM humana y la laminina alfa4.

Resumen de la invención reivindicada

25 La invención proporciona anticuerpos humanizados que comprenden una región variable madura de la cadena pesada que comprende tres CDRs de Kabat de SEQ ID N°s: 66-68 respectivamente, y que son al menos un 97% idénticas a la SEQ ID N°: 156, y una región variable madura de la cadena ligera que comprende tres CDRs de Kabat de SEQ ID N°s: 61-63, respectivamente, y que son al menos un 97% idénticas a la SEQ ID N°: 160. En algunos anticuerpos, la región variable madura de la cadena pesada es al menos un 98% o 99% idéntica a la SEQ ID N°: 156, y la región variable madura de la cadena ligera es al menos un 98% o 99% idéntica a la SEQ ID N°: 160. En algunos anticuerpos, la región variable madura de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 156 y la región variable madura de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 160. En algunos anticuerpos, la posición 93 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada está ocupada por T; la posición 42 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada está ocupada por E; la posición 43 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena ligera está ocupada por S; la posición 9 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada ligera está ocupada por S; la posición 19 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada ligera está ocupada por V. En algunos anticuerpos, la posición 93 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada está ocupada por T; la posición 42 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada está ocupada por E; la posición 3 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada está ocupada por K, la posición 43 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena ligera está ocupada por S; la posición 9 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada ligera está ocupada por S; la posición 19 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada ligera está ocupada por V.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

45 La invención proporciona además los anticuerpos mencionados anteriormente para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio caracterizado por infiltración de células que expresan MCAM en un sitio de inflamación en el cuerpo. Dicho trastorno inflamatorio puede ser un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC) caracterizado por la infiltración de células que expresan MCAM en el SNC.

50 La invención proporciona además los anticuerpos mencionados anteriormente para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, dermatitis de contacto alérgica, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, sarcoidosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn o cáncer (por ejemplo, tumores sólidos o hematológicos), como el melanoma.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa la identificación de clones críticos. Se representa el valor de unión medio de 1749.1.3 en función

de su valor medio de expresión en la superficie (rombos grises). Se aplicaron umbrales de <30% de reactividad de anticuerpos monoclonales y >50% de unión de sueros de ratón para identificar los clones (rombos negros) que fueron negativos para la unión del anticuerpo, pero positivos para la expresión en la superficie.

5 La FIG. 2 representa un modelo de homología de MCAM humana, que indica la ubicación de cinco residuos identificados como sitios de unión potencialmente críticos para 1749.1.3, incluidos C272, Y318, C320, V340 y W377.

La FIG. 3A representa una alineación de las secuencias de aminoácidos de 1749.1.3 con las regiones variables maduras de la cadena ligera de 1749 humanizado. ABA71407.1 y CAI99800.1 son la secuencia V_L aceptora humana. Las regiones CDR según la definición de Kabat se resaltan en gris.

10 La FIG. 3B representa una alineación de las secuencias de aminoácidos de 1749.1.3 con las regiones variables maduras de la cadena pesada de 1749 humanizado. AAX82494.1 y ADX65676.1 son la secuencia V_H aceptora humana. Las regiones CDR según la definición de Kabat se resaltan en gris.

Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID N°: 1 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena ligera del clon de anticuerpo 17.

15 La SEQ ID N°: 2 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID N°: 3 es la secuencia de aminoácidos de CDRL1 del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID N°: 4 es la secuencia de aminoácidos de CDRL2 del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID N°: 5 es la secuencia de aminoácidos de CDRL3 del clon de anticuerpo 17.

20 La SEQ ID N°: 6 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena pesada del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID N°: 7 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID N°: 8 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID N°: 9 es la secuencia de aminoácidos de CDRH2 del clon de anticuerpo 17.

25 La SEQ ID N°: 10 es la secuencia de aminoácidos de CDRH3 del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID N°: 11 es la secuencia de aminoácidos de la MCAM humana, N° de acceso CAA48332.

La SEQ ID N°: 12 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena ligera del clon de anticuerpo 15.

30 La SEQ ID N°: 13 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID N°: 14 es la secuencia de aminoácidos de CDRL1 del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID N°: 15 es la secuencia de aminoácidos de CDRL2 del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID N°: 16 es la secuencia de aminoácidos de CDRL3 del clon de anticuerpo 15.

35 La SEQ ID N°: 17 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena pesada del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID N°: 18 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID N°: 19 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID N°: 20 es la secuencia de aminoácidos de CDRH2 del clon de anticuerpo 15.

40 La SEQ ID N°: 21 es la secuencia de aminoácidos de CDRH3 del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID N°: 22 es la secuencia de aminoácidos del dominio 1 de MCAM humana (residuos 19-129).

La SEQ ID N°: 23 es la secuencia de aminoácidos del dominio 2 de MCAM humana (residuos 139-242).

La SEQ ID N°: 24 es la secuencia de aminoácidos del dominio 3 de MCAM humana (residuos 244-321).

ES 2 744 526 T3

La SEQ ID N°: 25 es la secuencia de aminoácidos del dominio 4 de MCAM humana (residuos 355-424).

La SEQ ID N°: 26 es la secuencia de aminoácidos del dominio 5 de MCAM humana (residuos 430-510).

La SEQ ID N°: 27 es la secuencia de aminoácidos de una isoforma de la cadena $\alpha 4$ de la laminina 411 humana (N° de acceso NP001098676).

- 5 La SEQ ID N°: 28 es la secuencia de aminoácidos de una isoforma de la cadena $\alpha 4$ de la laminina 411 humana (N° de acceso CAA48332).

La SEQ ID N°: 29 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 1174.1.3.

- 10 La SEQ ID N°: 30 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID N°: 31 es la secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID N°: 32 es la secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID N°: 33 es la secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo 1174.1.3.

- 15 La SEQ ID N°: 34 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID N°: 35 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID N°: 36 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID N°: 37 es la secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo 1174.1.3.

- 20 La SEQ ID N°: 38 es la secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID N°: 39 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID N°: 40 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 1414.1.2.

- 25 La SEQ ID N°: 41 es la secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID N°: 42 es la secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID N°: 43 es la secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID N°: 44 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 1414.1.2.

- 30 La SEQ ID N°: 45 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID N°: 46 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID N°: 47 es la secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID N°: 48 es la secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo 1414.1.2.

- 35 La SEQ ID N°: 49 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID N°: 50 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID N°: 51 es la secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo 1415.1.1.

- 40 La SEQ ID N°: 52 es la secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID N°: 53 es la secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID N°: 54 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena pesada del

ES 2 744 526 T3

anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID Nº: 55 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID Nº: 56 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo 1415.1.1.

5 La SEQ ID Nº: 57 es la secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID Nº: 58 es la secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID Nº: 59 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 1749.1.3.

10 La SEQ ID Nº: 60 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID Nº: 61 es la secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID Nº: 62 es la secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID Nº: 63 es la secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo 1749.1.3.

15 La SEQ ID Nº: 64 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID Nº: 65 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID Nº: 66 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID Nº: 67 es la secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo 1749.1.3.

20 La SEQ ID Nº: 68 es la secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID Nº: 69 es la secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID Nº: 70 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2120.4.19 expuesta en la SEQ ID Nº: 69.

25 La SEQ ID Nº: 71 es la secuencia de aminoácidos de una región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID Nº: 72 es la secuencia de aminoácidos de una región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID Nº: 73 es la secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo 2120.4.19.

30 La SEQ ID Nº: 74 es la secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID Nº: 75 es la secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID Nº: 76 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 2120.4.19.

35 La SEQ ID Nº: 77 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID Nº: 78 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID Nº: 79 es la secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID Nº: 80 es la secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo 2120.4.19.

40 La SEQ ID Nº: 81 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2107.4.10.

La SEQ ID Nº: 82 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2107.4.10 expuesta en la SEQ ID Nº: 81.

ES 2 744 526 T3

- La SEQ ID N°: 83 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2107.4.10.
- La SEQ ID N°: 84 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2107.4.10 expuesta en la SEQ ID N°: 83.
- 5 La SEQ ID N°: 85 es la secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo 2107.4.10.
- La SEQ ID N°: 86 es la secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo 2107.4.10.
- La SEQ ID N°: 87 es la secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo 2107.4.10.
- La SEQ ID N°: 88 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 2107.4.10.
- 10 La SEQ ID N°: 89 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 2107.4.10.
- La SEQ ID N°: 90 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo 2107.4.10.
- La SEQ ID N°: 91 es la secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo 2107.4.10.
- La SEQ ID N°: 92 es la secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo 2107.4.10.
- 15 La SEQ ID N°: 93 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 1749.1.3.
- La SEQ ID N°: 94 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 1749 versión 1 (VH1).
- La SEQ ID N°: 95 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 1749 versión 2 (VH2).
- 20 La SEQ ID N°: 96 es la secuencia de aminoácidos del donante de la región estructural variable de la cadena pesada U96282_VH.
- La SEQ ID N°: 97 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 1749.1.3.
- 25 La SEQ ID N°: 98 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 1749 versión 1 (VL1).
- La SEQ ID N°: 99 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 1749 versión 2 (VL2).
- La SEQ ID N°: 100 es la secuencia de aminoácidos del donante de la región estructural variable de la cadena ligera X02990_VL.
- 30 La SEQ ID N°: 101 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 2107.4.10.18.
- La SEQ ID N°: 102 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2107 versión 1 (VH1).
- 35 La SEQ ID N°: 103 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2107 versión 2 (VH2).
- La SEQ ID N°: 104 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2107 versión 3 (VH3).
- La SEQ ID N°: 105 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2107 versión 4A (VH4A).
- 40 La SEQ ID N°: 106 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2107 versión 5A (VH5A).
- La SEQ ID N°: 107 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2107 versión 6 (VH6).
- 45 La SEQ ID N°: 108 es la secuencia de aminoácidos del donante de la región estructural variable de la cadena pesada

ES 2 744 526 T3

AF062133_VH.

La SEQ ID N°: 109 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2107.4.10.18.

5 La SEQ ID N°: 110 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 2107 versión 1 (VL1).

La SEQ ID N°: 111 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 2107 versión 2 (VL2).

La SEQ ID N°: 112 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 2107 versión 3 (VL3).

10 La SEQ ID N°: 113 es la secuencia de aminoácidos del donante de la región estructural variable de la cadena ligera U86803.

La SEQ ID N°: 114 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo 2120.4.19.6.

15 La SEQ ID N°: 115 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2120 versión 1 (VH1).

La SEQ ID N°: 116 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2120 versión 2 (VH2).

La SEQ ID N°: 117 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2120 versión 3 (VH3).

20 La SEQ ID N°: 118 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2120 versión 4 (VH4).

La SEQ ID N°: 119 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2120 versión 5 (VH5).

25 La SEQ ID N°: 120 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo 2120.4.19.6.

La SEQ ID N°: 121 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 2120 versión 1 (VL1).

La SEQ ID N°: 122 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 2120 versión 2 (VL2).

30 La SEQ ID N°: 123 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 2120 versión 3 (VL3).

La SEQ ID N°: 124 es la secuencia de aminoácidos del donante de la región estructural variable de la cadena ligera X84343_VL.

La SEQ ID N°: 125 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.

35 La SEQ ID N°: 126 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.

La SEQ ID N°: 127 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.

La SEQ ID N°: 128 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada/cadena ligera humanizada.

La SEQ ID N°: 129 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.

40 La SEQ ID N°: 130 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.

La SEQ ID N°: 131 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.

La SEQ ID N°: 132 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.

La SEQ ID N°: 133 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.

La SEQ ID N°: 134 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.

ES 2 744 526 T3

- La SEQ ID N°: 135 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.
- La SEQ ID N°: 136 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.
- La SEQ ID N°: 137 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.
- La SEQ ID N°: 138 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.
- 5 La SEQ ID N°: 139 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo humanizado 2120 versión 3 (VH3).
- La SEQ ID N°: 140 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo humanizado 2120 versión 4 (VH4).
- La SEQ ID N°: 141 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo humanizado 2120 versión 5 (VH5).
- La SEQ ID N°: 142 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- La SEQ ID N°: 143 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- 10 La SEQ ID N°: 144 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- La SEQ ID N°: 145 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- La SEQ ID N°: 146 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- La SEQ ID N°: 147 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- La SEQ ID N°: 148 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- 15 La SEQ ID N°: 149 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- La SEQ ID N°: 150 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- La SEQ ID N°: 151 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo humanizado 2107 versión 1 (VH1).
- La SEQ ID N°: 152 es la secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo humanizado 2107 versión 4 (VH4).
- La SEQ ID N°: 153 es la secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo humanizado 2120 versión 1-5 (VH1-VH5).
- 20 La SEQ ID N°: 154 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena ligera humanizada.
- La SEQ ID N°: 155 es la secuencia de aminoácidos de una región estructural de la cadena pesada humanizada.
- La SEQ ID N°: 156 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 1749 versión 3 (VH3).
- 25 La SEQ ID N°: 157 es la secuencia de aminoácidos de la plantilla de la estructura de la región variable de la cadena pesada de ratón PBD#1HILVH.
- La SEQ ID N°: 158 es la secuencia de aminoácidos de la región estructural aceptora variable de la cadena pesada ACC#AAX82494.1.
- La SEQ ID N°: 159 es la secuencia de aminoácidos de la región estructural aceptora variable de la cadena pesada ACC#ADX65676.1.
- 30 La SEQ ID N°: 160 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 1749 versión 3 (VL3).
- La SEQ ID N°: 161 es la secuencia de aminoácidos de la plantilla de la estructura de la región variable de la cadena ligera de ratón PDB#2LTQVL.
- 35 La SEQ ID N°: 162 es la secuencia de aminoácidos de la región estructural aceptora variable de la cadena ligera ACC#ABA71407.1.
- La SEQ ID N°: 163 es la secuencia de aminoácidos de la región estructural aceptora variable de la cadena ligera CAI99800.1.
- La SEQ ID N°: 164 es la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal ejemplar que puede fusionarse a una región variable madura de la cadena pesada o de la cadena ligera.
- 40 La SEQ ID N°: 165 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal ejemplar codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 164.

La SEQ ID N°: 166 es la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal ejemplar que se puede fusionar a una región variable madura de la cadena pesada o de la cadena ligera.

La SEQ ID N°: 167 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal ejemplar codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 166.

- 5 La SEQ ID N°: 168 es la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal ejemplar que se puede fusionar a una región variable madura de la cadena pesada o de la cadena ligera.

La SEQ ID N°: 169 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal ejemplar codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 168.

- 10 La SEQ ID N°: 170 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena ligera de 1749 humanizado, con Arginina en el extremo N-terminal.

La SEQ ID N°: 171 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena ligera de 1749 humanizado, sin arginina en el extremo N-terminal.

La SEQ ID N°: 172 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de 1749 humanizado.

- 15 La SEQ ID N°: 173 es la secuencia de aminoácidos de una región constante del alotipo G1m3 de la cadena pesada de la versión BIP.

La SEQ ID N°: 174 es la secuencia de aminoácidos de una región constante del alotipo G1m3 de la cadena pesada de la versión BIP.

La SEQ ID N°: 175 es la secuencia de aminoácidos de una región de la cadena ligera madura del anticuerpo humanizado 1749 versión 3

- 20 (VL3 + región constante de la cadena ligera).

La SEQ ID N°: 176 es la secuencia de aminoácidos de una región de la cadena pesada madura del anticuerpo humanizado 1749 versión 3 (región constante de alotipo G1m3 de la cadena pesada de la versión VH3 + BIP).

La SEQ ID N°: 177 es la secuencia de aminoácidos de una región de la cadena pesada madura del anticuerpo humanizado 1749 versión 3 (región constante de alotipo G1m3 de la cadena pesada de la versión VH3 + BIP).

- 25 La SEQ ID N°: 178 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2107 versión 4B (VH4B).

La SEQ ID N°: 179 es la secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2107 versión 5B (VH5B).

Definiciones

- 30 Los anticuerpos monoclonales se proporcionan típicamente en forma aislada. Esto significa que un anticuerpo suele estar al menos un 50% p/p puro de proteínas y otras macromoléculas que surgen de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal se combine con un exceso de vehículo(s) farmacéutico(s) aceptable(s) u otro vehículo destinado a facilitar su uso. A veces, los anticuerpos monoclonales están al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95 o 99% p/p puros de proteínas y otras macromoléculas de la producción o purificación.

- 35 La unión específica de un anticuerpo monoclonal a su antígeno objetivo significa una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹. La unión específica es detectable con una mayor magnitud, y es distinguible de la unión inespecífica que se produce en al menos un objetivo no relacionado. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o una disposición espacial particular (por ejemplo, tipo de cerradura y llave), mientras que la unión inespecífica suele ser el resultado de las fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión específica no implica necesariamente que un anticuerpo monoclonal se una a un solo objetivo.

- 40 La unidad estructural del anticuerpo básico es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, y cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. Esta
- 45 región variable se expresa inicialmente vinculada a un péptido señal escindible. La región variable sin el péptido señal se denomina a veces región variable madura. Así, por ejemplo, una región variable madura de la cadena ligera significa una región variable de la cadena ligera sin el péptido señal de la cadena ligera. La parte carboxiterminal de cada cadena define una región constante que es la principal responsable de la función efectora.

- 50 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las

cadena ligera y pesada, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Véase, en general, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, NY, 1989, Cap. 7).

5 Las regiones variables maduras de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones estructurales relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada par están alineadas mediante las regiones estructurales, permitiendo la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N-terminal al C-terminal, tanto la cadena ligera como la pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901 - 917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342: 878-883 (1989). Kabat también proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada (numeración de Kabat) en la que a los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número (por ejemplo, H83 significa la posición 83 mediante la numeración de Kabat en la región variable madura de la cadena pesada; igualmente, la posición L36 significa la posición 36 mediante la numeración de Kabat en la región variable madura de la cadena ligera). La numeración de Kabat se utiliza en todo momento para referirse a las posiciones en la región variable de un anticuerpo, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

20 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del cual derivaron por la unión específica al objetivo, incluidas cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)_c, diacuerpos, Dabs, nanocuerpos, y Fv. Los fragmentos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

25 El término "anticuerpo" también incluye un anticuerpo biespecífico, y/o un anticuerpo quimérico, y/o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes (véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547 - 53 (1992)). En algunos anticuerpos biespecíficos, los dos pares de cadena pesada/ligera diferentes pueden incluir un par de cadena pesada/cadena ligera humanizado y un par de cadena pesada/cadena ligera específico de un epítipo diferente.

30 En algunos anticuerpos biespecíficos, un par de cadena pesada/cadena ligera es un anticuerpo humanizado como se describe más adelante, y el par de cadena pesada/ligera proviene de un anticuerpo que se une a un receptor expresado en la barrera hematoencefálica, como un receptor de insulina, un receptor de factor de crecimiento similar a insulina (IGF), un receptor de leptina o un receptor de lipoproteínas, o un receptor de transferrina (Friden et al., *PNAS* 88: 4771-4775, 1991; Friden et al., *Science* 259: 373-377, 1993). Dicho anticuerpo biespecífico puede transferirse a través de la barrera hematoencefálica por medio de la transcitosis mediada por receptor. La captación cerebral del anticuerpo biespecífico puede mejorarse aún más modificando el anticuerpo biespecífico para reducir su afinidad al receptor de la barrera hematoencefálica. La afinidad reducida por el receptor dio lugar a una distribución más amplia en el cerebro (véase, por ejemplo, Atwal et al. *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu et al. *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

40 Los anticuerpos biespecíficos ejemplares también pueden ser (1) un anticuerpo de dominio variable doble (DVD-Ig), donde cada cadena ligera y pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, en: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena simple que dan como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos objetivo; (3) un flexicuerpo, que es una combinación de scFvs con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (4) una molécula denominada molécula de "acoplamiento y cierre", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" de la proteína quinasa A, que, cuando se aplica a los Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (5) una denominada molécula escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos extremos de una región Fc humana. Los ejemplos de plataformas útiles para preparar anticuerpos biespecíficos incluyen, entre otros, BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab2 (F-Star), IgG1 con Fc modificado (Xencor) o DuoBody (basado en el intercambio del brazo Fab, Genmab).

55 El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítipo puede formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por el plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más generalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, Glenn E.

Morris, Ed. (1996).

Un anticuerpo "antagonista" u otro agente de unión es uno que inhibe una actividad biológica del antígeno al que se une. Dichos anticuerpos pueden inhibir sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

5 Los términos "actividad biológica" y "biológicamente activo", con respecto a MCAM, se refieren a su capacidad de unirse específicamente a su ligando (una cadena de laminina $\alpha 4$, por ejemplo, la cadena $\alpha 4$ de laminina 411) y/o de facilitar la infiltración de células que expresan MCAM, por ejemplo, células TH17, en el SNC.

10 "Inhibir" significa que un agente disminuye la actividad biológica de al menos un objetivo, por ejemplo, MCAM. Dicho inhibidor inhibe la actividad de al menos un objetivo en al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 100%.

Un "sujeto" incluye un sujeto humano u otro mamífero que recibe un tratamiento profiláctico o terapéutico.

15 Para los fines de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

25 El porcentaje de identidades de secuencia se determina con secuencias de anticuerpos alineadas al máximo mediante la convención de numeración de Kabat. Después de la alineación, si una región del anticuerpo en cuestión (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones del anticuerpo en cuestión y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región del anticuerpo de referencia como en la del anticuerpo en cuestión dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contabilizar los huecos, multiplicado por 100 para convertirlo en un porcentaje.

30 Las composiciones o métodos que comprenden uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos no enumerados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo puede contener el anticuerpo solo o en combinación con otros ingredientes.

La designación de un intervalo de valores incluye todos los números enteros dentro o que definen el intervalo, y todos los subintervalos definidos por números enteros dentro del intervalo.

35 A menos que sea evidente de otra manera por el contexto, el término "aproximadamente" abarca valores dentro de un margen estándar de error de medición (SEM) de un valor establecido.

La significación estadística significa $p \leq 0,05$.

Descripción detallada

I. GENERAL

40 Los anticuerpos con la propiedad útil de inhibir la unión de MCAM a la cadena $\alpha 4$ de laminina 411 se describen en los documentos WO/2012/170071 y PCT/US2013/058773. La presente solicitud, entre otras cosas, (a) proporciona nuevas formas humanizadas del anticuerpo 1749.1.3, (b) cartografía los epítopos a los que se une el anticuerpo 1749.1.3, y (c) proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo.

45 Los términos anticuerpo "1749.1.3", "m1749" o "1749 de ratón" se refieren a un clon de anticuerpo monoclonal derivado de ratón que tiene una cadena pesada variable madura que corresponde a la SEQ ID N°: 93 y una cadena ligera variable madura que corresponde a la SEQ ID NO: 97. "1749 humanizado" o "hu1749" se refiere a las variantes humanizadas del clon 1749.1.3. La variante humanizada de 1749 que tiene una región variable madura de la cadena pesada correspondiente a la SEQ ID N°: 156 y una región variable madura de la cadena ligera correspondiente a la SEQ ID N°: 160 se denomina en la presente memoria "hu1749VH3VL3".

II. MOLÉCULAS OBJETIVO

50 La MCAM humana de tipo natural (molécula de adhesión a células de melanoma, también conocida como CD146 y MUC18) es un péptido de 646 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MGLPRLVCAFLLAACCCCPVAGVPGAEQPAPELVEVEVGSTALLKCGLSQSQGNLSHVDWFSVHKEKRTLIFRVR
 QGQQQSEPGYEYEQRLSLQDRGATLALTQVTPQDERIFLCQGKRPRSQEYRIQLRVYKAPEEPNIQVNPLGIPVNSKE
 PEEVATCVGRNGYPIPVQVIWYKNGRPLKEEKNRVHIQSSQTVESSGLYTLQSILKAQLVKEDKDAQFYCELNYRLPSG
 NHMKESREVTVPVFPYPTKVVLEVEPVGMLKEGDRVEIRCLADGNPPPHFSISKQNPSTREAEETNDNGVLVLEP
 5 ARKEHSGRYECQAWNLDTMISLLSEPQELLVNYVSDVRVSPAAPERQEGSSLTLTCEAESSQDLEFQWLREETDQVL
 ERGPVLQLHDLKREAGGGYRCVASVPSIPGLNRTQLVKLAIFGPPWMAFKERKVVVKENMVLNLSCEASGHRPTIS
 WNVNGTASEQDQDPQRVLSTLNLVLTPELLETGVECTASNDLGKNTSILFLELVNLTTLTPDSNTTTGLSTSTASPHTR
 ANSTSTERKLPEPESRGWIVAVIVCIVLAVLAVLYFLYKKGKLPKRSGKQEITLPPSRKTELVEVKSDKLPEEMGL
 LQGSSGDKRAPGDQGEKYIDLRH (SEQ ID N°: 11).

10 (Base de datos GenBank con el Número de Acceso AAA20922.1 (CAA48332). La MCAM es una glicoproteína de la
 superficie celular que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas involucrada en la adhesión celular y en la
 cohesión de la monocapa endotelial en las uniones intercelulares en el tejido vascular. También promueve la
 progresión tumoral de muchos cánceres, como los tumores sólidos, que incluyen el melanoma y el cáncer de próstata.
 Se sabe que interactúa de una manera homotípica/homofílica y también puede unirse a otros ligandos. La MCAM
 15 humana incluye cinco dominios de inmunoglobulina (1: residuos de aminoácidos 19-129; 2: residuos de aminoácidos
 139-242; 3: residuos de aminoácidos 244-321; 4: residuos de aminoácidos 335-424; y 5: residuos de aminoácidos
 430-510), que se muestran como SEQ ID N°s: 22-26.

A menos que sea evidente de otra manera por el contexto, la referencia a MCAM o sus fragmentos incluye las
 secuencias de aminoácidos humanas de tipo natural indicadas anteriormente y sus variantes alélicas humanas.

20 La laminina $\alpha 4$ se refiere a una de las cadenas polipeptídicas encontradas en las moléculas de laminina, que se
 expresan en la lámina basal (de la membrana basal), una base de red de proteínas para la mayoría de las células y
 órganos. Se sabe que las lamininas se unen a las membranas celulares a través de las moléculas de la membrana
 plasmática y contribuyen a la unión celular. La cadena $\alpha 4$ de laminina forma típicamente un complejo con una cadena
 β de laminina y una cadena γ de laminina. La cadena $\alpha 4$ de laminina se encuentra en numerosas moléculas de
 25 laminina, incluida la laminina 411 (laminina 8 o $\alpha 4\beta 1\gamma 1$); laminina 421 (laminina 9 o $\alpha 4\beta 2\gamma 1$), y laminina 423 (laminina
 14 o $\alpha 4\beta 2\gamma 3$). Hay dos isoformas principales de la cadena $\alpha 4$ de laminina humana: los números de acceso de GenBank
 NP001098676 y CAA48332 (SEQ ID N°s: 27 y 28). "Laminina 411" se refiere a un complejo polipeptídico trimérico
 formado por tres subunidades o cadenas polipeptídicas: cadena $\alpha 4$, una cadena $\beta 1$ y una cadena $\gamma 1$.

30 Los antagonistas contra MCAM incluyen anticuerpos, proteínas de fusión de receptores o ligandos a una región
 constante de IgG, otras moléculas de unión biológica y moléculas pequeñas. Los anticuerpos pueden ser
 monoclonales o policlonales. Los anticuerpos pueden ser no humanos, como de ratón o rata, primates no humanos, o
 pueden ser humanos. Los anticuerpos pueden ser quiméricos, recubiertos, humanizados, primatizados y similares.

35 Un antagonista de MCAM se refiere a un antagonista que inhibe total o parcialmente la capacidad de MCAM de (i)
 unirse específicamente a su ligando: una cadena $\alpha 4$ de laminina, por ejemplo, la cadena $\alpha 4$ de laminina 411; y/o (ii)
 facilitar que una célula que expresa MCAM, por ejemplo, una célula TH17, se infiltre o migre hacia el tejido de un
 sujeto. Los antagonistas de MCAM incluyen anticuerpos u otros antagonistas que se unen a MCAM o a su ligando
 laminina alfa 4.

III. Anticuerpos

A. Formas humanizadas del anticuerpo anti-MCAM 1749

40 Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado genéticamente en el que las CDRs de un anticuerpo "donante"
 no humano se injertan en secuencias de anticuerpos "aceptores" humanos (véase, por ejemplo, Queen et al.,
 documentos US 5.530.101 y 5.585.089; Winter et al., documento US 5.225.539; Carter, documento US 6.407.213;
 Adair, documentos US 5.859.205 y 6.881.557; y Foote, documento US 6.881.557). Las secuencias del anticuerpo
 45 aceptor pueden ser, por ejemplo, una secuencia de región variable madura de un anticuerpo humano, un compuesto
 de tales secuencias, una secuencia consenso de secuencias de regiones variables de un anticuerpo humano (por
 ejemplo, secuencias consenso de regiones variables de la cadena ligera y pesada de Kabat, 1991, anteriormente
 mencionado), o una secuencia de región variable de la línea germinal.

50 Los ejemplos de una secuencia aceptora para la cadena pesada son las regiones variables de la cadena pesada
 maduras humanas con códigos de acceso NCBI AAX82494.1 (GI: 62421461) y/o ADX65676.1 (GI: 323432073).
 Preferiblemente, se usa un compuesto de estos aceptores, como es el caso en los presentes ejemplos. Estas
 secuenciasceptoras incluyen dos CDRs que tienen la misma forma canónica y una CDR-H3 de la misma longitud
 con una base retorcida como la cadena pesada de m1749, y AAX82494.1 tiene una identidad de secuencia del 91%
 y ADX65676.1 tiene una identidad de secuencia del 83% en la región estructural de la región variable de la cadena
 55 pesada. Para la cadena ligera, los ejemplos de una secuencia aceptora son las regiones variables maduras de la
 cadena ligera con los códigos de acceso NCBI ABA71407.1 (GI: 77379502) y/o CAI99800.1 (GI: 98956324).
 Preferiblemente, se usa un compuesto de estas secuencias, como es el caso en los presentes ejemplos. Estas
 secuenciasceptoras incluyen tres CDR que tienen la misma forma canónica que una cadena ligera de m1749, y
 ABA71407.1 tiene una identidad de secuencia del 85% y CAI99800.1 tiene una identidad de secuencia del 83% en la

región estructural de la región variable de la cadena ligera.

La invención proporciona anticuerpos humanizados que tienen tres CDRs de la cadena ligera y tres de la cadena pesada, como se define según Kabat completamente o sustancialmente del anticuerpo m1749 donante, y las secuencias estructurales de la región variable madura y las regiones constantes, si están presentes, completamente o sustancialmente de secuencias de anticuerpos humanos. Del mismo modo, una cadena pesada humanizada es una cadena pesada que tiene tres CDRs de la cadena pesada, como se define según Kabat, completamente o sustancialmente de la cadena pesada del anticuerpo m1749, y una secuencia variable de la cadena pesada madura y una secuencia de la región constante de la cadena pesada, si están presentes, completamente o sustancialmente de una secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo humano. Del mismo modo, una cadena ligera humanizada es una cadena ligera que tiene tres CDRs de la cadena ligera, como se define según Kabat, completamente o sustancialmente de la cadena ligera del anticuerpo m1749, y una secuencia variable madura de la cadena ligera y una secuencia de la región constante de la cadena ligera, si están presentes, completamente o sustancialmente de una secuencia de la cadena ligera de un anticuerpo humano. Algunos anticuerpos comprenden una cadena pesada humanizada que comprende la CDR1 de Kabat de SEQ ID N°: 66; SYIMS; CDR2 de Kabat de SEQ ID N°: 67: TISSGGSSTYYPDSVKG; CDR3 de Kabat de SEQ ID N°: 68: DDDYDVKVFAY. Algunos anticuerpos comprenden una cadena ligera humanizada que comprende la CDR1 de Kabat de SEQ ID N°: 61: KSSRSLNSRIRKNYLA; CDR2 de Kabat de SEQ ID N°: 62: WASTRES; CDR3 de Kabat de SEQ ID N°: 63: KQSYN-LLT. Algunos anticuerpos comprenden una cadena pesada humanizada que comprende las tres CDRs de Kabat de las SEQ ID N°: 66, 67 y 68, y una cadena ligera humanizada que comprende las tres CDRs de Kabat de las SEQ ID N°: 61, 62 y 63. Una CDR es sustancialmente de m1749 si al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los residuos son idénticos a los residuos correspondientes en la CDR correspondiente de m1749, excepto por las posiciones de Kabat 60-65 de CHR2 que pueden estar sustituidas. Las secuencias estructurales de la región variable madura de una cadena de anticuerpo o la secuencia de la región constante de una cadena de anticuerpo son sustancialmente de una secuencia estructural de una región variable madura humana o una secuencia de una región constante humana, respectivamente, cuando al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los residuos correspondientes definidos por Kabat son idénticos.

Ciertos aminoácidos de los residuos estructurales de la región variable madura humana pueden seleccionarse para la sustitución en función de su posible influencia en la conformación de las CDRs y/o la unión al antígeno, la mediación en la interacción entre las cadenas pesadas y ligeras, la interacción con la región constante, ser un sitio para una modificación postraduccional deseada o no deseada, ser un residuo inusual por su posición en una secuencia de una región variable humana y, por lo tanto, potencialmente inmunógeno, entre otras razones. Las siguientes seis posiciones de la región estructural de la región variable se consideraron candidatas para las sustituciones por una o más de estas razones, como se especifica en los Ejemplos (D9S, A19V, P43S, Q3K, G42E, A93T).

Aquí como en cualquier otro lugar, el primer residuo mencionado es el residuo de un anticuerpo humanizado formado injertando CDRs de Kabat en una región estructural aceptora humana, y el segundo residuo mencionado es un residuo que se considera que reemplaza a dicho residuo. Por lo tanto, en las regiones estructurales de las regiones variables, el primer residuo mencionado es humano y dentro de las CDRs, el primer residuo mencionado es de ratón (por ejemplo, C97S).

Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer en las CDRs. Una posible variación es sustituir ciertos residuos en las CDRs del anticuerpo m1749 con residuos correspondientes de secuencias de CDRs humanas, típicamente de las CDRs de las secuenciasceptoras humanas usadas en el diseño de los anticuerpos humanizados ejemplificados. En algunos anticuerpos, solo una parte de las CDRs, es decir, el subconjunto de residuos de CDR necesarios para la unión, denominados SDRs, son necesarios para retener la unión en un anticuerpo humanizado. Los residuos de la CDR que no entran en contacto con el antígeno y que no están en las SDRs pueden identificarse basándose en estudios previos (por ejemplo, los residuos H60-H65 de la CDR H2 a menudo no son necesarios), de regiones de CDRs de Kabat que se encuentran fuera de los bucles hipervariables de Chothia (Chothia, J. Mol. Biol. 196: 901, 1987), mediante modelización molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. En dichos anticuerpos humanizados en posiciones en las que uno o más residuos de CDR del donante están ausentes o en los que se omite una CDR del donante, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (por la numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de tales sustituciones de aminoácidos a incluir del aceptor por el donante en las CDRs refleja un equilibrio de consideraciones en competencia. Dichas sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, en consecuencia, disminuir la inmunogenicidad potencial. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y preferiblemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDRs y los aminoácidos a sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

Una razón para realizar una sustitución dentro de una CDR es que un residuo de ratón es un sitio de modificación postraduccional que puede interferir con la expresión o el ensamblaje de un anticuerpo.

La invención proporciona variantes del anticuerpo 1749 humanizado en las que la región variable madura de la cadena pesada humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID N°: 156, y la región variable madura de la cadena ligera humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de

identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 160. Algunos de estos anticuerpos humanizados incluyen tres CDRs de la cadena pesada y tres de la ligera, total o sustancialmente idénticas a las regiones CDR de hu1749, que son las mismas que las del anticuerpo donante de ratón. Las regiones CDR pueden definirse mediante cualquier definición convencional (por ejemplo, de Chothia), pero son preferiblemente como se define mediante Kabat.

5 El anticuerpo 1749 humanizado en el que la región variable madura de la cadena pesada humanizada es la SEQ ID N°: 156 y la región variable madura de la cadena ligera humanizada es la SEQ ID N°: 160 se denomina 1749VH3VL3. Algunas variantes del anticuerpo 1749VH3VL3 humanizado retienen algunas o todas las retromutaciones en hu1749VH3VL3. En otras palabras, al menos 1, 2, 3, 4, 5, o preferiblemente las 6 siguientes están presentes: H3 está ocupado por K, H42 está ocupado por E, H93 está ocupado por T, L9 está ocupado por S, L19 está ocupado por V, y
10 L43 está ocupado por S.

Además de retener al menos 1, 2, 3, 4, 5, o preferiblemente las 6 retromutaciones de hu1749VH3VL3, los anticuerpos 1749 humanizados también pueden contener retromutaciones adicionales en las regiones estructurales de las regiones variables. Los ejemplos de tales retromutaciones secundarias incluyen H1 ocupado por D, H10 ocupado por D, H13 ocupado por K, H19 ocupado por K, H113 ocupado por A, L5 ocupado por S, L15 ocupado por A, L18 ocupado por K, L21 ocupado por M, L63 ocupado por T, L78 ocupado por V, L83 ocupado por L, L100 ocupado por A, L104 ocupado por L, y/o L106 ocupado por L. Para la selección de retromutaciones para un producto terapéutico o diagnóstico, se debe tener en cuenta el grado en que, en general, no mejoran la afinidad, y el grado en que la introducción de más residuos de ratón puede aumentar el riesgo de inmunogenicidad.

En cualquiera de los anticuerpos anteriores, se pueden hacer otras sustituciones de aminoácidos en la región estructural de la región variable madura, por ejemplo, en residuos que no están en contacto con las CDRs. A menudo, los reemplazos realizados en la variante de secuencias humanizadas son conservativos con respecto a los aminoácidos reemplazados.

B. Selección de la región constante

Las regiones variables de la cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, recubiertos o humanizados pueden unirse a al menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad dependiente del complemento. Por ejemplo, los isotipos humanos IgG1 e IgG3 tienen citotoxicidad dependiente del complemento, y los isotipos humanos IgG2 e IgG4 no la tienen. Las IgG1 e IgG3 humanas también inducen funciones efectoras mediadas por células más fuertes que las IgG2 e IgG4 humanas. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa.

Uno o varios aminoácidos del extremo aminoterminal o carboxiterninal de la cadena ligera y/o pesada, como la lisina C-terminal de la cadena pesada, pueden faltar o derivatizarse en una proporción o en todas las moléculas. Se pueden hacer sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora, como la citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC (véase, por ejemplo, Winter et al., Patente de EE. UU. N° 5.624.821; Tso et al., Patente de EE. UU. N° 5.834.597; y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005, 2006), o para prolongar la vida media en humanos (véase, por ejemplo, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279: 6213, 2004). Las sustituciones ejemplares incluyen una Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428 (se usa la numeración EU en este párrafo para la región constante) para aumentar la vida media de un anticuerpo. La sustitución en cualquiera o en todas las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 reduce la afinidad por los receptores Fcγ, particularmente el receptor FcγRI (véase, por ejemplo, el documento US 6.624.821). Se puede usar una sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de la IgG1 humana para reducir las funciones efectoras. Algunos anticuerpos tienen una sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de la IgG1 humana para reducir las funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y/o 237 en IgG2 humana están sustituidas con alanina, y la posición 235 con glutamina (véase, por ejemplo, el documento US 5.624.821). En algunos anticuerpos, se utiliza una mutación en una o más de las posiciones 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 y 331 por la numeración EU de IgG1 humana. En algunos anticuerpos, se utiliza una mutación en una o más de las posiciones 318, 320 y 322 por la numeración EU de IgG1 humana. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 y/o 235 están sustituidas con alanina y/o la posición 329 está sustituida con glicina. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 y 235 están sustituidas con alanina, como en la SEQ ID N°: 174. En algunos anticuerpos, el isotipo es IgG2 o IgG4 humano. Una región constante kappa de la cadena ligera humana ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 170. La arginina N-terminal de la SEQ ID N°: 170 se puede omitir, en cuyo caso la región constante kappa de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 171. Una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 172 (con o sin la lisina C-terminal). Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena simple en los que los dominios variables maduros de las cadenas pesada y ligera están unidos a través de un espaciador.

Las regiones constantes humanas muestran una variación alotípica y una variación isoalotípica entre diferentes individuos, es decir, las regiones constantes pueden diferir en diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos difieren de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimórfica de uno o más isotipos diferentes. Así, por ejemplo, otra región constante de la cadena pesada

es del alotipo IgG1 G1m3 y tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 173. Otra región constante de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 173, excepto porque carece de la lisina C-terminal. Otra región constante de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 174. Otra región constante de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 174, excepto porque carece de la lisina C-terminal.

La descripción proporciona además ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las regiones constantes anteriores. Opcionalmente, dichos ácidos nucleicos codifican además un péptido señal y pueden expresarse con el péptido señal unido a la región constante.

C. Expresión de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos pueden producirse mediante expresión recombinante. En los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos pueden optimizarse los codones para la expresión en el tipo de célula deseado (por ejemplo, CHO o Sp2/0). Las construcciones de ácidos nucleicos recombinantes típicamente incluyen una secuencia de control de la expresión unida de forma operable a las secuencias codificantes de las cadenas de anticuerpos, incluidas las regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Las secuencias de control de la expresión pueden ser sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión a alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada. El vector o vectores que codifican las cadenas de anticuerpos también pueden contener un gen seleccionable, tal como la dihidrofolato reductasa, para permitir la amplificación del número de copias de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpos.

E. coli es un huésped procariota particularmente útil para expresar anticuerpos, particularmente fragmentos de anticuerpos. Los microbios, como la levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un ejemplo de un huésped de levadura, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen la 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Las células de mamífero se pueden usar para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas celulares CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas que no producen anticuerpos, que incluyen Sp2/0 y NS0. Puede ser ventajoso utilizar células no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y los sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme del ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional. Las secuencias de control de la expresión adecuadas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino y similares. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148: 1149 (1992).

Habiendo introducido el/los vector(es) que codifica(n) cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos en cultivos celulares, se pueden analizar grupos de células para determinar la productividad del cultivo y la calidad del producto en medios sin suero. Los grupos de células que producen los mejores productos pueden someterse luego a una clonación de una sola célula basada en FACS para generar líneas monoclonales. Pueden ser ventajosas productividades específicas por encima de 50 pg o 100 pg por célula por día, que corresponden a títulos de productos de más de 7,5 g/L de cultivo. Los anticuerpos producidos por clones de células individuales también se pueden ensayar para determinar la turbidez, las propiedades de filtración, PAGE, IEF, barrido UV, HP-SEC, cartografía de carbohidratos-oligosacáridos, espectrometría de masas y ensayos de unión, como ELISA o Biacore. Un clon seleccionado puede almacenarse después en múltiples viales y almacenarlo congelado para su uso posterior.

Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos convencionales de la técnica, que incluyen la captura con proteína A, cromatografía en columna (por ejemplo, interacción hidrófoba o intercambio iónico), bajo pH para inactivación viral y similares (véase, en general, Scopes, *Protein Purification* Springer-Verlag, NY, 1982)).

Metodología para la producción comercial de anticuerpos que incluye la optimización de codones, selección de promotores, elementos de transcripción y terminadores, clonación de células individuales sin suero, bancos de células, uso de marcadores de selección para la amplificación del número de copias, terminador de CHO, clonación de células individuales sin suero, mejora de los títulos de proteínas (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.786.464, US 5.888.809, US 6.063.598, US 6.114.148, US 7.569.339, WO2004/050884, WO2005/019442, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2008/107388, y WO2008/012142).

D. Ácidos nucleicos

La descripción proporciona además ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras

5 descritas anteriormente. Típicamente, los ácidos nucleicos también codifican un péptido señal fusionado con las cadenas pesadas y ligeras maduras (por ejemplo, péptidos señal que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s: 165, 167 y 169 que pueden codificarse mediante las SEQ ID N°s: 164, 166, y 168). Las secuencias de codificación en ácidos nucleicos pueden estar en una unión operable con secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias de codificación, tales como un promotor, potenciador, sitio de unión al ribosoma, señal de terminación de la transcripción y similares. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden aparecer en forma aislada o pueden clonarse en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis en estado sólido o PCR de oligonucleótidos solapantes. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden unirse como un ácido nucleico contiguo, por ejemplo, dentro de un vector de expresión, o pueden estar separados, por ejemplo, cada uno clonado en su propio vector de expresión.

10 E. Caracterización de los epítomos de MCAM para la unión de anticuerpos y producción de anticuerpos que se unen a los mismos

1. Epítomos de MCAM para la unión de anticuerpos

15 La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a epítomos específicos dentro de la proteína MCAM humana. Algunos anticuerpos de la invención se unen al mismo epítomo o a uno solapante, como el anticuerpo designado 1749.1.3 (m1749).

20 La invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítomo o a uno solapante, como el anticuerpo designado m1749. Las mutaciones en los residuos 272, 318, 320, 340 y 377 de MCAM interrumpen la unión específica de m1749 (por ejemplo, <30% de unión a MCAM mutante en comparación con una MCAM de tipo natural de control positivo como se describe en los ejemplos). Debido a que relativamente pocos residuos afectan a la unión, y los residuos están espaciados más ampliamente que un epítomo lineal típico (por ejemplo, 3-20 aminoácidos contiguos), estos resultados proporcionan una indicación de que m1749 se une a un epítomo conformacional. Alternativamente, uno o más de los residuos que afectan a la unión pueden hacerlo de forma alostérica sin contacto directo con el anticuerpo.

25 Los anticuerpos que se unen a un epítomo que incluye uno o más de los residuos 272, 318, 320, 324, 326, 340 y 377 de MCAM, y en particular a un epítomo que incluye uno o más de los residuos 318, 324 y 326, es probable que compartan propiedades inhibitorias útiles con m1749. Por lo tanto, los anticuerpos cuya unión específica es inhibida por la mutagénesis de uno o más de los residuos 318, 324 y 326, y particularmente el residuo 318 de MCAM, es probable que compartan propiedades similares a m1749. Algunos de estos anticuerpos se unen a un epítomo que incluye o que consiste en el residuo 318, 324 y/o 326 de MCAM. El epítomo puede ser lineal, como un epítomo (por ejemplo, 2-5, 3-5, 3-10, 3-15, 3-20, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-60 o 5-70 aminoácidos contiguos) que incluye 1, 2 o 3 de los aminoácidos especificados (318, 324 y 326) o puede ser conformacional, que incluye o consiste en 1, 2, o 3 de los aminoácidos especificados.

2. La generación de anticuerpos que se unen a epítomos de MCAM específicos

35 Algunos anticuerpos de la invención se unen al mismo epítomo o a uno solapante al del anticuerpo m1749. La producción de otros anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murinos, cobayas, primates, conejos o ratas, contra la MCAM humana se puede lograr, por ejemplo, inmunizando al animal con la MCAM humana o un fragmento peptídico de la misma que incluya el epítomo deseado (el "inmunógeno"), y el cribado de los anticuerpos resultantes en función de la unión a MCAM, opcionalmente en competencia con m1749 (véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988)). Opcionalmente, el inmunógeno se conjuga con una molécula portadora. Opcionalmente, el inmunógeno se administra con un adyuvante. Se pueden usar varios tipos de adyuvantes como se describe a continuación. Se prefiere el adyuvante completo de Freund seguido del adyuvante incompleto para la inmunización de animales de laboratorio. Normalmente se utilizan conejos o conejillos de Indias para hacer anticuerpos policlonales. Los ratones se utilizan típicamente para hacer anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se criban para determinar la unión específica a un epítomo deseado dentro de MCAM.

45 La descripción proporciona fragmentos peptídicos de MCAM que se usan para crear anticuerpos dirigidos a los epítomos descritos anteriormente. Los ejemplos de tales péptidos incluyen un péptido que tiene una longitud de 2-5, 3-5, 3-10, 3-15, 3-20, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-60, o 5-70 aminoácidos contiguos e incluye al menos uno de los residuos de aminoácidos 318, 324 y 326 de MCAM. En algunos de estos péptidos, el péptido incluye los tres residuos de aminoácidos 318, 324 y 326.

50 Los inmunógenos pueden conjugarse con moléculas portadoras, típicamente un polipéptido portador, y así ayudan a provocar una respuesta inmunitaria contra el fragmento conjugado con el portador. Un solo agente puede unirse a un solo portador, varias copias de un agente pueden unirse a múltiples copias de un portador, que a su vez están unidas entre sí, varias copias de un agente pueden unirse a una sola copia de un portador, o una sola copia de un agente puede unirse a múltiples copias de un portador, o diferentes portadores. Los vehículos adecuados incluyen albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico o un toxoide de otras bacterias patógenas, como la difteria (p. ej., CRM₁₉₇), *E. coli*, cólera o *H. pylori*, o un derivado atenuado de toxina.

Los inmunógenos a menudo se administran con adyuvantes farmacéuticamente aceptables. El adyuvante aumenta el

título de los anticuerpos inducidos y/o la afinidad de unión de los anticuerpos inducidos respecto de la situación si el péptido se usara solo. Se puede usar una variedad de adyuvantes en combinación con un fragmento inmunógeno de MCAM para provocar una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten a la forma cualitativa de la respuesta.

5 Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (MPL™) (véase el documento GB 2220211 (RIBI Immuno-Chem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glucósido triterpénico o saponina aislado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina hallado en América del Sur (véase Kensil et al., en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); documento US 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; ahora Antigenics, Inc., Nueva York, NY). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (como el escualeno o el aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunitarios, como el monofosforil lípido A (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)), polímeros de tipo Pluronic, y micobacterias muertas. Otro adyuvante es CpG (documento WO 98/40100). Los adyuvantes pueden administrarse como un componente de una composición terapéutica con un agente activo, o pueden administrarse por separado, antes, simultáneamente o después de la administración del agente terapéutico.

3. Tipos de anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos pueden ser no humanos, como de ratón o rata, primates no humanos, o pueden ser humanos. Los anticuerpos pueden ser quiméricos, recubiertos, humanizados, primatizados y similares.

20 Los anticuerpos monoclonales se humanizan utilizando los métodos descritos anteriormente y los métodos descritos en Queen, documentos US 5.530.101 y 5.585.089; Winter, documento US 5.225.539, Carter, documento US 6.407.213, Adair, documentos US 5.859.205 y 6.881.557, Foote, documento US 6.881.557.

La invención proporciona además formas quiméricas y recubiertas de anticuerpos no humanos que se unen específicamente a los epítomos de MCAM descritos anteriormente.

25 Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que las regiones variables maduras de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón) se combinan con las regiones constantes de las cadenas ligeras y pesadas humanas. Dichos anticuerpos conservan sustancial o totalmente la especificidad de unión del anticuerpo de ratón, y tienen aproximadamente dos tercios de la secuencia humana.

30 Un anticuerpo recubierto es un tipo de anticuerpo humanizado que retiene algunas y generalmente todas las CDRs y algunos de los residuos de la región estructural de la región variable no humana de un anticuerpo no humano, pero reemplaza otros residuos de la región estructural de la región variable que pueden contribuir a los epítomos de células B o T, por ejemplo, residuos expuestos con residuos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo humano (Padlan, Mol. Immunol. 28: 489, 1991). El resultado es un anticuerpo en el que las CDRs son total o sustancialmente de un anticuerpo no humano, y las regiones estructurales de las regiones variables del anticuerpo no humano se hacen más parecidas a las humanas por las sustituciones.

35 Los anticuerpos humanos contra MCAM se proporcionan mediante una variedad de técnicas que se describen a continuación. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan mediante experimentos de unión competitiva, mediante el método de presentación en fagos de Winter, anteriormente mencionado, o de otra manera, para tener la misma especificidad hacia el epítomo que un anticuerpo de ratón particular, como uno de los anticuerpos monoclonales de ratón descritos en los ejemplos. Los anticuerpos humanos también pueden analizarse para determinar la especificidad hacia un epítomo particular utilizando solo un fragmento de MCAM como antígeno objetivo, y/o cribando anticuerpos contra una colección de mutantes por delección de MCAM.

45 Los métodos para producir anticuerpos humanos incluyen el método de trioma de Oestberg et al., Hybridoma 2: 361-367 (1983); Oestberg, patente de EE.UU. nº 4.634.664; y Engleman et al., Patente de EE. UU. nº 4.634.666, el uso de ratones transgénicos que incluyen genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Lonberg et al., documento WO93/12227 (1993); documentos US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, documento WO 91/10741 (1991) y los métodos de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Dower et al., documento WO 91/17271 y McCafferty et al., documentos WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332.

50 Los anticuerpos quiméricos, humanizados (incluyendo los recubiertos) y humanos se producen típicamente mediante expresión recombinante como se describió anteriormente.

55 La descripción proporciona además moléculas de unión que no son anticuerpos. Las moléculas de unión que no son anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticálina, que se basan en el armazón de lipocalina, una estructura proteica caracterizada por un barril beta rígido que soporta cuatro bucles hipervariables que forman el sitio de unión al ligando. Las nuevas especificidades de unión están diseñadas mediante mutagénesis aleatoria dirigida en las regiones de los bucles, en combinación con la expresión funcional y la selección guiada (Skerra (2008) FEBS J. 275: 2677-2683). Otros armazones adecuados pueden incluir, por ejemplo, adnectinas o monocuerpos, basados en el décimo dominio extracelular de la fibronectina III humana (Koide y Koide (2007) Methods Mol. Biol. 352: 95-109); aficuerpos, basados

en el dominio Z de la proteína A estafilocócica (Nygren et al. (2008) FEBS J. 275: 2668-2676)); DARPin, basados en proteínas de repetición de anquirina (Stumpp et al. (2008) Drug. Discov. Today 13: 695-701); finómeros, basados en el dominio SH3 de la proteína quinasa Fyn humana (Grabulovski et al. (2007) J. Biol. Chem. 282: 3196-3204); afitinas, basadas en Sac7d de *Sulfolobus acidolarius* (Krehenbrink et al. (2008) J. Mol. Biol. 383: 1058-1068); afinas, basadas en la cristalina y-B humana (Ebersbach et al. (2007) J. Mol. Biol. 372: 172-185); avímeros, basados en los dominios A de las proteínas receptoras de membrana (Silverman et al. (2005) Biotechnol. 23: 1556-1561); péptidos de knottina ricos en cisteína (Kolmar (2008) FEBS J. 275: 2684-2690); e inhibidores de tipo Kunitz (Nixon y Wood (2006) Curr. Opin. Drug. Discov. Dev. 9: 261-268). Para una revisión, véase Gebauer y Skerra (2009) Curr. Opin. Chem. Biol. 13: 245-255.

10 En algunos de estos anticuerpos, el anticuerpo no es uno cualquiera de los anticuerpos o anticuerpos que incluyen CDRs (según lo definido por Kabat, Chothia o una combinación de los mismos) completamente o sustancialmente de los anticuerpos descritos en los documentos WO/2012/170071 y PCT/US2013/058773, particularmente los anticuerpos denominados clon 15 (definidos por SEQ ID N°s: 12-21) y clon 17 (definidos por SEQ ID N°s: 1-10) en el documento WO/2012/170071 y los clones monoclonales anti-MCAM humana de ratón denominados 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1 y 1749.1.3, y los clones de anticuerpo monoclonal anti-MCAM humana de rata denominados 2120.4.19 y 2107.4.10 descritos en el documento PCT/US2013/058773.

4. Métodos de cribado de anticuerpos en función de la actividad

La actividad inhibitoria de los anticuerpos hacia MCAM descritos en la presente memoria puede analizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluidos los ensayos de unión competitiva con anticuerpos que se unen al mismo epítopo o uno similar (por ejemplo, m1749) y el bloqueo de la unión de MCAM con su ligando, la cadena $\alpha 4$ de laminina 411.

Por ejemplo, la actividad de los anticuerpos hacia MCAM de bloquear la interacción entre MCAM y la cadena $\alpha 4$ de laminina 411 se puede analizar de la siguiente manera. Las células que expresan MCAM (a) se incuban con un polipéptido recombinante que comprende una cadena $\alpha 4$ de laminina, por ejemplo, una cadena $\alpha 4$ de laminina 411, en presencia o ausencia de un anticuerpo candidato; (b) se controla el nivel de unión de la laminina $\alpha 4$ a las células, por ejemplo, mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo; y (c) se identifica dicho anticuerpo candidato como un inhibidor de la interacción MCAM/laminina $\alpha 4$ si el nivel de unión de la laminina $\alpha 4$ es menor en presencia que en ausencia del anticuerpo candidato. Un protocolo de cribado alternativo implica el uso de una población de células que expresan una cadena $\alpha 4$ de laminina, que se puede incubar con MCAM, en presencia y ausencia de un anticuerpo candidato, y la unión de MCAM a la población celular monitorizada. Si la unión de MCAM a la población celular en presencia del anticuerpo candidato es menor que en su ausencia, el anticuerpo candidato es un antagonista de MCAM.

Otros métodos de monitorización incluyen la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

35 Los antagonistas de MCAM identificados en función de su capacidad de inhibir la unión de MCAM a su ligando, por ejemplo, una cadena $\alpha 4$ de laminina, son candidatos para el tratamiento de afecciones inflamatorias caracterizadas por la infiltración de células que expresan MCAM.

La actividad inhibitoria de un anticuerpo hacia MCAM también puede evaluarse *in vivo*. Un ejemplo de una metodología para evaluar la actividad inhibitoria de un anticuerpo hacia MCAM es con un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune (EAE). EAE es una enfermedad que se genera en animales de laboratorio para producir síntomas similares a los de la esclerosis múltiple (EM) en humanos. Véase, por ejemplo, Bauer et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 106: 1920-1925 (2009). La EAE generalmente se produce inyectando a los animales diferentes proteínas del sistema nervioso central de otros animales, por ejemplo, extractos de proteína básica de mielina y tejido de la médula espinal o cerebro completo, o con células T que reaccionan específicamente a la mielina. La EAE se usa comúnmente para seguir el curso de las recaídas o formas progresivas de la EM. EAE ha servido como modelo animal adecuado tanto para desarrollar agentes terapéuticos para la EM como para estudiar los procesos de la enfermedad específica de la EM. Véase, por ejemplo, Gold et al., Brain 129: 1953-1971 (2006); véase también Steinman et al., Ann. Neurol. 60, 12-21 (2006).

Los efectos del bloqueo de MCAM sobre la progresión de la enfermedad se pueden examinar en un modelo terapéutico de EAE en el que la polarización de TH17 se produce *in vivo*. Los ratones se inmunizan con el péptido 139-151 de PLP para inducir EAE. Después de la aparición de la enfermedad, los ratones se tratan por vía intraperitoneal con un anticuerpo anti-MCAM candidato o un control de isotipo, y todos los días a partir de entonces. Los ratones se monitorizan diariamente y se puntúan con enmascaramiento, y los pesos corporales se obtienen cada 2-3 días. Un retraso en la recaída y una reducción significativa en la gravedad de los síntomas en los ratones tratados con un anticuerpo hacia MCAM candidato es indicativo de un anticuerpo candidato eficaz.

F. Anticuerpos conjugados

Los anticuerpos conjugados que se unen específicamente a MCAM pueden ser útiles para seleccionar como objetivo el cáncer o las células tumorales para su destrucción, o para seleccionar como objetivo las células involucradas en

enfermedades autoinmunes o enfermedades neuroinflamatorias. Dichos anticuerpos también pueden ser útiles para seleccionar como objetivo cualquier enfermedad mediada, al menos en parte, por la expresión de MCAM. Por ejemplo, tales anticuerpos pueden conjugarse con otros agentes terapéuticos, otras proteínas, otros anticuerpos y/o marcadores detectables. Véanse los documentos WO 03/057838; US 8.455.622. Dichos agentes terapéuticos pueden ser cualquier agente que pueda usarse para tratar, combatir, recuperar, prevenir o mejorar una afección o enfermedad indeseada en un paciente, como una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer. Los agentes terapéuticos pueden incluir agentes citotóxicos, agentes citostáticos, agentes radioterapéuticos, inmunomoduladores o cualquier agente biológicamente activo que facilite o aumente la actividad del anticuerpo. Un agente citotóxico puede ser cualquier agente tóxico para una célula. Un agente citostático puede ser cualquier agente que inhiba la proliferación celular. Un inmunomodulador puede ser cualquier agente que estimule o inhiba el desarrollo o el mantenimiento de una respuesta inmunológica. Un agente radioterapéutico puede ser cualquier molécula o compuesto que emita radiación. Si dichos agentes terapéuticos se acoplan a un anticuerpo específico hacia MCAM, como los anticuerpos descritos en la presente memoria, los agentes terapéuticos acoplados tendrán una afinidad específica por las células que expresan MCAM (por ejemplo, células inmunitarias, como las células que expresan TH17 o células cancerosas, como los melanocitos malignos) respecto de otras células. En consecuencia, la administración de los anticuerpos conjugados selecciona como objetivo directamente las células que expresan MCAM con efectos mínimos en otras células y tejidos circundantes. Esto puede ser particularmente útil para los agentes terapéuticos que son demasiado tóxicos para administrarlos solos. Además, se pueden usar cantidades más pequeñas de los agentes terapéuticos.

Los anticuerpos se pueden modificar para que actúen como inmunotoxinas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.194.594. Por ejemplo, la ricina, una toxina celular derivada de plantas, se puede acoplar a los anticuerpos usando los reactivos bifuncionales anhídrido S-acetilmercapto-succínico para el anticuerpo y 3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo para ricina. Véase Pietersz et al., *Cancer Res.* 48 (16): 4469-4476 (1998). El acoplamiento da como resultado la pérdida de la actividad de unión a la cadena B de la ricina, mientras que no afecta ni al potencial tóxico de la cadena A de la ricina ni a la actividad del anticuerpo. De manera similar, la saporina, un inhibidor del ensamblaje ribosómico, se puede acoplar a los anticuerpos a través de un enlace disulfuro entre grupos sulfhidrilo insertados químicamente. Véase Polito et al., *Leukemia* 18: 1215-1222 (2004).

Los radioisótopos también pueden unirse a los anticuerpos. Los radioisótopos preferidos incluyen itrio⁹⁰ (90Y), indio¹¹¹ (111In), ¹³¹I, ^{99m}Tc, radioplatina-111, radiooro-199 y bismuto²¹³. La unión de radioisótopos a los anticuerpos puede realizarse con quelatos bifuncionales convencionales. Para unir radioplatina-111 y radiooro-199, se pueden usar enlaces basados en azufre. Véase Hazra et al., *Cell Biophys.* 24-25: 1-7 (1994). La unión de los radioisótopos de plata puede implicar la reducción de la inmunoglobulina con ácido ascórbico. Para los radioisótopos como 111In y 90Y, se puede usar ibritumomab tiuxetan, y reaccionará con dichos isótopos para formar 111In-ibritumomab tiuxetan y 90Y-ibritumomab tiuxetan, respectivamente. Véase Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Supl. 1: S91-S95 (2001).

También se pueden unir otros agentes terapéuticos a anticuerpos. Los agentes terapéuticos suelen ser citotóxicos o citostáticos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden conjugarse con fármacos quimioterapéuticos tóxicos como la maitansina, geldanamicina, inhibidores de tubulina, como auristatinas, o agentes de unión al surco menor, como caliqueamicina. Otros agentes terapéuticos representativos incluyen agentes que se sabe que son útiles para el tratamiento, manejo o mejora de una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer, o los síntomas de una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos se describen en otra parte en la presente memoria.

Los anticuerpos también se pueden acoplar con otras proteínas. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden acoplar con finómeros. Los finómeros son pequeñas proteínas de unión (por ejemplo, 7 kDa) derivadas del dominio SH3 de Fyn humano. Pueden ser estables y solubles, y pueden carecer de residuos de cisteína y enlaces disulfuro. Los finómeros pueden diseñarse para unirse a las moléculas objetivo con la misma afinidad y especificidad que los anticuerpos. Son adecuados para crear proteínas de fusión multiespecíficas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, los finómeros pueden fusionarse a los extremos N-terminal y/o C-terminal de los anticuerpos para crear FinomAbs bi y tri-específicos con diferentes arquitecturas. Los finómeros pueden seleccionarse utilizando bibliotecas de finómeros a través de tecnologías de detección que utilizan FACS, Biacore y ensayos basados en células que permiten una selección eficiente de los finómeros con propiedades óptimas. Se describen ejemplos de finómeros en Grabulovski et al., *J. Biol. Chem.* 282: 3196-3204 (2007); Bertschinger et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter et al., *MAbs.* 4: 497-508 (2011); Banner et al., *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69 (Pt6): 1124-1137 (2013); y Brack et al., *Mol. Cancer Ther.* 13: 2030-2039 (2014).

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden acoplarse o conjugarse con uno o más anticuerpos diferentes (por ejemplo, para formar heteroconjugados de anticuerpos). Tales otros anticuerpos pueden unirse a diferentes epítopos dentro de la MCAM o pueden unirse a un antígeno objetivo diferente.

Los anticuerpos también se pueden acoplar con una etiqueta detectable. Dichos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para diagnosticar una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer, para monitorizar la progresión de una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer, y/o para evaluar la eficacia del tratamiento. Dichos anticuerpos pueden ser útiles para realizar tales determinaciones en sujetos

que tienen o son susceptibles a una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer, o en muestras biológicas apropiadas obtenidas de tales sujetos. Los marcadores detectables representativos que se pueden acoplar o unir a un anticuerpo incluyen diversas enzimas, tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, como estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotri-azinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, como luminol; materiales bioluminiscentes, tales como luciferasa, luciferina y aecuorina; materiales radioactivos, como radioplatá-111, radiooro-199, bismuto²¹³, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn y ¹¹⁷estaño; metales emisores de positrones que se utilizan en diversas tomografías de emisión de positrones; iones metálicos paramagnéticos no radiactivos; y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas a radioisótopos específicos.

Los agentes terapéuticos, otras proteínas, otros anticuerpos y/o marcadores detectables se pueden acoplar o conjugar, directa o indirectamente, a través de un intermedio (por ejemplo, un enlazador), a un anticuerpo murino, quimérico, recubierto o humanizado usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies for Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985); y Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982). Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores escindibles y no escindibles. Se pueden emplear diferentes enlazadores que liberan los fármacos en condiciones ácidas o reductoras o al exponerlos a proteasas específicas. Asimismo, se pueden emplear diferentes enlazadores que liberan los agentes terapéuticos, proteínas, anticuerpos y/o marcadores detectables acoplados en condiciones ácidas o reductoras, o al exponerlos a proteasas específicas o en otras condiciones definidas.

IV. MÉTODOS DE TRATAMIENTO Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Los anticuerpos u otros antagonistas descritos pueden usarse para tratar o llevar a cabo la profilaxis de sujetos que tienen (por ejemplo, que cumplen los criterios reconocidos en la técnica, como los del DSM-IV-TR o DSM-V) o con riesgo elevado con respecto a la población general de una enfermedad autoinmune, neuroinflamatoria y cáncer, entre otras. El riesgo elevado puede evaluarse a partir de la presencia de uno o más marcadores genéticos o bioquímicos asociados a la enfermedad, o uno o más síntomas compatibles con la enfermedad pero insuficientes para permitir un diagnóstico definitivo. Las categorías o enfermedades mencionadas anteriormente no son necesariamente excluyentes entre sí; por ejemplo, la esclerosis múltiple se puede clasificar como neuroinflamatoria o autoinmune. Algunas enfermedades ejemplares específicas que se pueden tratar con los métodos actuales incluyen la esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, dermatitis alérgica de contacto, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, sarcoidosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn y cáncer, particularmente tumores sólidos, como el melanoma. Aunque la práctica de los métodos no depende de la comprensión del mecanismo, se cree que en algunos métodos los anticuerpos u otros antagonistas funcionan al menos en parte inhibiendo la interacción de la MCAM expresada en las células T (por ejemplo, células TH17) y la cadena $\alpha 4$ de laminina, por ejemplo, una cadena $\alpha 4$ de laminina 411 expresada en la superficie de una célula endotelial. Los conjugados anticuerpo-fármaco pueden tener mecanismos de acción adicionales, que incluyen el efecto citotóxico o citostático del agente unido, típicamente después de la absorción dentro de la célula objetivo. Los conjugados anticuerpo-fármaco también pueden inducir toxicidad por los macrófagos asociados a tumores.

Las afecciones neuroinflamatorias se caracterizan por inflamación del SNC y/o daño celular/tisular. Los signos pueden incluir un aumento de la activación glial, un aumento de los niveles de citocinas/quimiocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF α , INF γ , IL-1 β), un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y/o un aumento del reclutamiento/invasión de células inmunitarias (por ejemplo, leucocitos) en el SNC. La neuroinflamación es a menudo crónica, asociada a la activación crónica de las células del sistema inmunitario (es decir, neuroinflamación asociada a autoinmunidad), pero puede tener episodios agudos alternativos o adicionales.

La esclerosis múltiple es una enfermedad preferida para el tratamiento en cualquiera de sus al menos cuatro subtipos. La EM recurrente-remitente (EM-RR) es la forma más común de EM, y se caracteriza por exacerbaciones/recaídas claramente definidas (ataques agudos) seguidas de una recuperación parcial o completa. No hay progresión de la enfermedad entre los periodos de recaída. Inicialmente (en el momento del diagnóstico), la EM-RR representa aproximadamente el 85% de todos los sujetos recién diagnosticados. La definición de recaída requiere que el nuevo síntoma o signo esté presente durante al menos 24 horas, que no esté asociado a fiebre o enfermedad intercurrente (como la "gripe" o una infección del tracto urinario), porque una temperatura corporal elevada puede desenmascarar lesiones asintomáticas o antiguas.

La progresiva primaria (EM-PP) es continua desde el principio, sin recaídas claras. Puede haber mesetas (períodos

de estabilización). El 10-15% de todos los sujetos con EM están en este grupo, y tiende a ocurrir en individuos de edad avanzada. La proporción entre mujeres y hombres es igual en este grupo, a diferencia de otras formas donde las mujeres predominan en aproximadamente 2:1. Además, la EM-PP tiende a presentarse con menos cambios en la IRM cerebral y más cambios relacionados con la mielopatía/médula espinal.

- 5 Una forma secundaria progresiva (EM-SP) comienza como una EM-RR y luego se produce una progresión constante con o sin recaídas. Aproximadamente el 50% de los sujetos con EM recurrente-remitente avanzan a la forma secundaria progresiva.

Una forma de recaída progresiva (EM-RP), que ocurre en aproximadamente el 5% de los individuos, es progresiva desde el inicio con recaídas superpuestas (con o sin recuperación).

- 10 El diagnóstico de la EM generalmente se basa en un historial médico, un examen neurológico y varias pruebas, incluidas las imágenes de resonancia magnética (IRM), los potenciales evocados (PE) y el análisis del líquido cefalorraquídeo. Un diagnóstico definitivo de EM requiere evidencias de daños en al menos dos áreas separadas del sistema nervioso central (SNC), que incluyen el cerebro, la médula espinal y los nervios ópticos, y evidencias de que los daños ocurrieron con una diferencia de al menos un mes, y la exclusión de todos los demás posibles diagnósticos.
- 15 Además de tratar terapéuticamente a los sujetos que tienen un diagnóstico de EM según criterios reconocidos en la técnica, los métodos actuales también se pueden usar de manera profiláctica para tratar a individuos que tienen al menos un signo o síntoma de EM, lo que los coloca en un mayor riesgo de progresión a EM en comparación con la población general de individuos sanos. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para tratar a los individuos que han tenido un ataque (también llamado recaída o exacerbación) de síntomas similares a la EM, conocidos como síndrome clínicamente aislado (SCA), que pueden o no continuar para desarrollar EM. Los individuos con riesgo de desarrollar EM también pueden identificarse por la presencia de un anticuerpo contra la proteína KIR4.1 en su suero, entre otros métodos.
- 20

- La enfermedad neuroinflamatoria también incluye la enfermedad de Parkinson. Los síntomas de la enfermedad de Parkinson incluyen temblor (p. ej., temblor en las manos, brazos, piernas, mandíbula y cara); rigidez de las extremidades y del tronco; bradicinesia o lentitud de movimientos; inestabilidad postural o alteración del equilibrio y la coordinación; depresión y otros cambios emocionales; dificultad para tragar, masticar y hablar; problemas urinarios o estreñimiento; problemas de la piel; trastornos del sueño. La enfermedad de Parkinson se puede diagnosticar a partir de estos síntomas y/o escáneres cerebrales y/u otras pruebas para descartar otras enfermedades.
- 25

- Los presentes métodos pueden usarse para inhibir el crecimiento o la metástasis del cáncer. Los cánceres pueden ser tumores malignos hematopoyéticos o tumores sólidos, es decir, masas de células que resultan de un crecimiento o proliferación celular excesivo, ya sea benigno o maligno, lo que incluye las lesiones precancerosas. Los cánceres pueden ser benignos, malignos o metastásicos. El cáncer metastásico se refiere a un cáncer que se diseminó desde el lugar donde comenzó a otro lugar en el cuerpo. Los tumores formados por células cancerosas metastásicas se denominan tumor metastásico o metástasis, un término que también se usa para referirse al proceso mediante el cual las células cancerosas se propagan a otras partes del cuerpo. En general, el cáncer metastásico tiene el mismo nombre y el mismo tipo de células cancerosas que el cáncer original o primario. Los ejemplos de cáncer incluyen tumores sólidos, como melanoma, carcinoma, blastoma y sarcoma. Los cánceres también incluyen tumores malignos hematológicos, como leucemia o tumores malignos linfoides, como el linfoma. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer endometrial o carcinoma uterino, cáncer de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.
- 30
- 35
- 40

- Las enfermedades autoinmunes incluyen enfermedades autoinmunes sistémicas, enfermedades autoinmunes específicas de órganos o tejidos, y enfermedades que exhiben expresiones de tipo autoinmune. En estas enfermedades, el cuerpo desarrolla una respuesta inmune celular y/o humoral contra uno de sus propios antígenos, lo que lleva a la destrucción de ese antígeno y puede causar consecuencias graves y/o fatales. La respuesta celular, si está presente, puede ser de células B o de células T, o ambas. Se ha informado que las células TH17, células auxiliares de linaje T caracterizadas por la producción de interleucina (IL)-17 e IL-22, entran en los tejidos para facilitar las respuestas autoinmunes patógenas, incluida la esclerosis múltiple en humanos y la encefalomielititis autoinmune experimental (EAE) en ratones. Véase, por ejemplo, Cua et al., Nature 421: 744-748 (2003); Ivonov et al., Cell 126: 1121-1133 (2006). Las células TH17 pueden iniciar o propagar una respuesta inflamatoria por su reclutamiento específico e infiltración del tejido.
- 45
- 50

- Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen la enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, el síndrome poliglandular autoinmune, diabetes mellitus dependiente de insulina (diabetes tipo 1), diabetes mellitus resistente a la insulina (diabetes tipo 2), infertilidad mediada por el sistema inmunitario, enfermedad de Addison autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, alopecia autoinmune, vitíligo, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, anemia perniciosa, miastenia grave, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de la persona rígida, fiebre reumática aguda, oftalmia simpática, síndrome de
- 55
- 60

Goodpasture, uveítis autoinmune, arteritis temporal, enfermedad de Behcet, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, ooforitis autoinmune, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, espondilitis anquilosante, arteritis de Takayashu, paniculitis, penfigoide, vasculitis de origen desconocido, vasculitis ANCA-negativa, vasculitis ANCA-positiva, lupus eritematoso sistémico, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, vasculitis necrosante sistémica, granulomatosis de Wegener, síndrome CREST, síndrome antifosfolípido, síndrome de Sjögren, gastroenteritis eosinofílica, dermatitis tópica atípica, cardiomiopatía, síndromes post-infecciosos, endomiocarditis postinfecciosa, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple, sarcoidosis y psoriasis.

Los anticuerpos u otros antagonistas se administran en un régimen efectivo que significa una dosis, una vía de administración y una frecuencia de administración que retrasa la aparición, reduce la gravedad, inhibe un mayor deterioro y/o mejora al menos un signo o síntoma de una enfermedad que se está tratando (por ejemplo, cáncer). Si un paciente ya sufre un trastorno, el régimen se puede denominar régimen terapéuticamente eficaz. Si el paciente tiene un riesgo elevado de padecer el trastorno respecto de la población general, pero aún no tiene síntomas, el régimen puede considerarse un régimen profilácticamente eficaz. En algunos casos, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede observar en un paciente individual respecto de los controles históricos o la experiencia pasada en el mismo paciente. En otros casos, la eficacia terapéutica o profiláctica puede demostrarse en un ensayo clínico o preclínico en una población de pacientes tratados respecto de una población de control de pacientes sin tratar.

Las dosis ejemplares para un anticuerpo son 0,1-20, o 0,5-5 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4 o 5 mg/kg) o 10-1500 mg como una dosis fija. La dosis depende del estado del paciente y de la respuesta al tratamiento anterior, si lo hay, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico y si el trastorno es agudo o crónico, entre otros factores.

La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. Se prefiere la administración en la circulación sistémica mediante administración intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, por infusión durante un período de 30-90 minutos.

La frecuencia de administración depende de la vida media del anticuerpo en la circulación, el estado del paciente y la vía de administración, entre otros factores. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral o a intervalos irregulares en respuesta a los cambios en el estado del paciente o la progresión del trastorno que se está tratando. Una frecuencia ejemplar para la administración intravenosa es entre semanal y trimestral a lo largo de un curso continuo de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Para la administración subcutánea, una frecuencia de dosificación ejemplar es de diaria a mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.

El número de dosis administradas depende de si el trastorno es agudo o crónico, y de la respuesta del trastorno al tratamiento. Para los trastornos agudos o las exacerbaciones agudas de un trastorno crónico, a menudo son suficientes entre 1 y 10 dosis. A veces, una única dosis en inyección rápida, opcionalmente en forma dividida, es suficiente para un trastorno agudo o la exacerbación aguda de un trastorno crónico. El tratamiento puede repetirse para la recurrencia de un trastorno agudo o la exacerbación aguda. Para los trastornos crónicos, puede administrarse un anticuerpo a intervalos regulares, por ejemplo, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, trimestralmente, cada seis meses durante al menos 1, 5 o 10 años, o la vida del paciente.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferiblemente estériles y sustancialmente isotónicas, y se fabrican en condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma de dosis unitaria (es decir, la dosis para una administración única). Las composiciones farmacéuticas pueden formularse utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables. La formulación depende de la vía de administración elegida. Para la inyección, los anticuerpos pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, como la solución de Hank, la solución de Ringer o solución salina fisiológica o tampón acetato (para reducir las molestias en el lugar de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para su reconstitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril apirógena, antes del uso.

El tratamiento con los anticuerpos de la invención se puede combinar con otros tratamientos efectivos contra el trastorno que se está tratando. Los tratamientos de combinación se pueden formular para administrarse por separado. Los agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la esclerosis múltiple incluyen uno o más de los siguientes: teriflunomida, interferón beta-1a, interferón beta-1b, acetato de glatiramer, fingolimod y mitoxantrona, o un corticosteroide, como prednisona, metilprednisolona o dexametasona.

Los agentes terapéuticos adicionales para el cáncer incluyen agentes alquilantes tales como carmustina, clorambucilo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, procarbazona y ciclofosfamida; antimetabolitos tales como fluorouracilo, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, metotrexato e hidroxiaurea; productos naturales que incluyen alcaloides de plantas y antibióticos como bleomicina, doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, etopósido, mitomicina, mitoxantrona, vinblastina, vincristina y Taxol (paclitaxel) o compuestos relacionados tales como Taxotere®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 irinotecán; temozolomida y Gliadel®, carmustina; e inhibidores de las tirosina quinasas, tales como

Gleevec®, Sutent®. (sunitinib malato), Nexavar® (sorafenib) y Tarceva® (erlotinib) o Iressa® (gefitinib); inhibidores de la angiogénesis; y anticuerpos monoclonales, incluido Herceptin® contra el antígeno HER2; Avastin® contra VEGF; o anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) como Erbitux® (cetuximab) y Vectibix® (panitumumab).

- 5 Los agentes adicionales para tratar la enfermedad de Parkinson incluyen levodopa, benzaserida, carbidopa, agonistas de dopamina, agonistas de dopamina distintos de ergot, inhibidores de catecol-O-metilo ("COMT") como, por ejemplo, entacona o tolcofona, inhibidores de monoamina oxidasa ("MAO"), como, por ejemplo, rasagalina, amantadina o agentes anticolinérgicos.

V. KITS

- 10 La descripción proporciona además kits (por ejemplo, recipientes) que comprenden los anticuerpos MCAM u otros antagonistas de la invención y materiales relacionados, tales como instrucciones de uso (por ejemplo, un prospecto). Las instrucciones de uso pueden contener, por ejemplo, instrucciones para la administración de los antagonistas de MCAM y opcionalmente uno o más agentes adicionales. Los recipientes de antagonista(s) de MCAM pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes de dosis múltiples) o dosis en subunidades.
- 15 El prospecto se refiere a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

- Los kits también pueden incluir un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, como agua para inyección bacteriostática (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.
- 20

- Si se asocian diferentes versiones de una secuencia con un número de acceso en diferentes momentos, se entiende la versión asociada con el número de acceso en la fecha de presentación efectiva de esta solicitud. La fecha de presentación efectiva se refiere a la fecha de presentación anterior de la fecha de presentación concreta o la fecha de presentación de una solicitud de prioridad que se refiere al número de acceso, si es aplicable. Del mismo modo, si se publican diferentes versiones de una publicación, sitio web o similares en diferentes momentos, se entiende la versión más recientemente publicada en la fecha de presentación efectiva de la solicitud, a menos que se indique lo contrario. Cualquier característica, etapa, elemento, realización o aspecto de la invención se puede usar en combinación con cualquier otro a menos que se indique específicamente lo contrario. Aunque la presente invención se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y de ejemplo con fines de claridad y comprensión, será evidente que pueden ponerse en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 25
- 30

Ejemplos

Materiales y métodos

Generación/caracterización de anticuerpos

- 35 Para la generación de anticuerpos capaces de unirse a MCAM murina, se generó MCAM-Fc fusionando el dominio extracelular de MCAM murina a IgG humana, y se produjo en células CHO utilizando técnicas convencionales. Se inmunizaron ratas Lou/M con 100 µg de proteína MCAM-Fc en CFA (volumen 1: 1). Las ratas se reforzaron dos veces a intervalos de dos semanas con proteína MCAM-Fc en adyuvante incompleto de Freund (IFA) (volumen 1: 1). Se generaron hibridomas a partir de las ratas inmunizadas utilizando protocolos convencionales, y los clones se seleccionaron mediante Clonepix. Las células CHO se transfectaron con el gen MCAM murino de longitud completa y se seleccionaron para la expresión estable utilizando neomicina y técnicas convencionales. Las células CHO originales (negativas para MCAM) se marcaron de manera fluorescente con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE) usando técnicas convencionales y se mezclaron en una proporción 1:1 con células CHO transfectadas con MCAM sin marcar. Los sobrenadantes de hibridoma se incubaron con esta mezcla de células durante 30 minutos y se detectó la unión de posibles anticuerpos específicos hacia MCAM con un anticuerpo secundario anti-rata marcado de forma fluorescente (Jackson Immuno) mediante citometría de flujo.
- 40
- 45

- Los sobrenadantes de hibridomas que fueron positivos para los anticuerpos específicos hacia MCAM se incubaron previamente con proteína MCAM-Fc de ratón marcada con fluorescencia (5 µg/mL) durante 30 minutos antes de la adición a la línea celular WM2664 que expresaba laminina α4, y se determinó la neutralización de la unión de la proteína MCAM-Fc a la línea celular mediante citometría de flujo.
- 50

- Para la generación de anticuerpos de rata capaces de unirse a MCAM humana, se generó hMCAM-Fc fusionando el dominio extracelular de MCAM humana a IgG humana, y se produjo en células CHO usando técnicas convencionales. Se inmunizaron ratas Lou/M con 250 µg de proteína hMCAM-Fc en CFA (volumen 1:1). Las ratas se reforzaron dos veces a intervalos de dos semanas con la proteína hMCAM-Fc en adyuvante incompleto de Freund (IFA) (volumen 1:1). Se generaron hibridomas a partir de las ratas inmunizadas utilizando protocolos convencionales, y los clones se seleccionaron mediante Clonepix. Las células CHO se transfectaron con el gen MCAM humano de longitud completa
- 55

y se seleccionaron para la expresión estable utilizando neomicina y técnicas convencionales. Las células CHO originales (negativas para MCAM) se marcaron de forma fluorescente con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE) usando técnicas convencionales, y se mezclaron en una proporción 1:1 con células CHO transfectadas con MCAM humana sin marcar. Los sobrenadantes de hibridoma se incubaron con esta mezcla de células durante 30 minutos y se detectó la unión de los anticuerpos específicos potenciales hacia MCAM humana con un anticuerpo secundario anti-rata marcado con fluorescencia (Jackson Immuno) mediante citometría de flujo.

Para la generación de anticuerpos de ratón capaces de unirse a MCAM humana, se generó hMCAM-Fc fusionando el dominio extracelular de MCAM humana con IgG humana, y se produjo en células CHO usando técnicas convencionales. Se inmunizaron ratones Balb/c con 50 µg de proteína hMCAM-Fc en CFA (volumen 1:1). Los ratones se reforzaron dos veces a intervalos de dos semanas con la proteína hMCAM-Fc en adyuvante incompleto de Freund (IFA) (volumen 1:1). Se generaron hibridomas a partir de ratones inmunizados utilizando protocolos convencionales, y los clones se seleccionaron mediante Clonex. Las células CHO se transfectaron con el gen MCAM humano de longitud completa y se seleccionaron para la expresión estable utilizando neomicina y técnicas convencionales. Las células CHO originales (negativas para MCAM) se marcaron de forma fluorescente con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE) usando técnicas convencionales, y se mezclaron en una proporción 1:1 con células CHO transfectadas con MCAM humana sin marcar. Los sobrenadantes de hibridoma se incubaron con esta mezcla de células durante 30 minutos y se detectó la unión de anticuerpos específicos potenciales hacia MCAM humana con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con fluorescencia (Jackson Immuno) mediante citometría de flujo.

Los sobrenadantes de hibridomas que dieron positivo para anticuerpos humanos específicos hacia MCAM se incubaron previamente con proteína hMCAM-Fc marcada con fluorescencia (5 µg/mL) durante 30 minutos antes de la adición a la línea celular WM2664 que expresaba laminina $\alpha 4$, y se determinó la neutralización de la unión de la proteína hMCAM-Fc a la línea celular mediante citometría de flujo.

Manipulación de ácidos nucleicos y proteínas

Para la determinación de las CDRs, se aisló el ARN total de las células de hibridoma usando el kit RNAqueous-4PCR (Ambion), y se usó para la síntesis de ADNc. La primera y segunda cadenas de ADNc se sintetizaron utilizando métodos modificados de la amplificación de ADNc de Marathon (Clontech) con el adaptador de ADNc ligado al extremo 5' del ADNsc obtenido. El cebador específico inverso se diseñó en función de la secuencia de la región constante del isotipo del anticuerpo específico para cadenas tanto pesadas como ligeras, y se usó junto con el cebador adaptador en la amplificación mediante PCR de los fragmentos VL y VH utilizando la ADN polimerasa Pfu Ultra (Stratagene). El producto de PCR amplificado se clonó en pCR-Blunt-TOPO (Invitrogen) y se determinó la secuencia de nucleótidos. Las secuencias de los clones identificados se compararon para determinar el porcentaje de identidad en las secuencias VL y VH.

Para la determinación de las concentraciones de IL-17 en el sobrenadante, se realizó un ELISA utilizando un kit comercial (R&D Systems).

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos monoclonales anti-MCAM

Los anticuerpos monoclonales de ratón y rata dirigidos contra la proteína MCAM humana se generaron como se describe en los Materiales y Métodos anteriormente. La unión específica entre el anticuerpo monoclonal y la MCAM humana se confirmó evaluando la capacidad del anticuerpo monoclonal de unirse a las células transfectadas con la MCAM humana. Para esto, las células sin transfectar se marcaron con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE) y se mezclaron con células transfectadas con MCAM humana sin marcar. Por lo tanto, se pudieron distinguir las células sin transfectar.

Usando estas técnicas, se aislaron 823 clones de fusiones de ratón independientes, y se mostró que expresaban un anticuerpo capaz de unirse a la MCAM humana. Además, se aislaron 152 clones de fusiones de rata independientes, y se demostró que expresaban un anticuerpo capaz de unirse a la MCAM humana.

A continuación, se usaron los anticuerpos monoclonales anti-MCAM humana para ensayar su capacidad de bloquear la unión de MCAM humana a su ligando. La proteína MCAM-Fc humana (5 µg/ml) se incubó previamente con un anticuerpo de control de isotipo, o 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal de ensayo durante 30 minutos en PBS. La mezcla se añadió a cortes de tejido de médula espinal sana y posteriormente se caracterizó mediante microscopía de fluorescencia como se describió en Materiales y métodos anteriormente. Además, las células CHO parentales (CHOK1) o las células CHO transfectadas con un gen MCAM humano se preincubaron con medios de cultivo de CHO (DMEM), laminina 411 recombinante (10 µg/ml) o laminina 511 recombinante (es decir, laminina 10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$)) (10 µg/ml) a 37 °C durante 45 minutos. Se lavaron las células y se detectó la unión específica de la laminina 411, pero no de la laminina 511, a MCAM con un anticuerpo hacia pan-laminina mediante citometría de flujo. La preincubación de las células CHO transfectadas con MCAM humana con el anticuerpo anti-MCAM (a 20 µg/ml), antes de la incubación con laminina, suprimió la unión de MCAM humana a laminina 411.

Utilizando esta técnica, se demostró que 87 de los 823 clones de fusión de ratón independientes y 26 de los 152 clones de fusión de rata independientes descritos anteriormente expresaban un anticuerpo que era capaz de bloquear la interacción entre la proteína MCAM humana y su ligando, la cadena $\alpha 4$ de laminina.

Ejemplo 2. Caracterización adicional de anticuerpos monoclonales anti-MCAM

Los 87 clones de fusión de ratón independientes y los 26 clones de fusión de rata independientes descritos en el Ejemplo 1 anterior, capaces de (i) unirse a MCAM humana, y (ii) bloquear la interacción entre MCAM humana y la cadena α -4 de laminina, se caracterizaron adicionalmente como sigue. En primer lugar, se determinó la cuantificación de CI50 por la capacidad del anticuerpo monoclonal de bloquear la unión de MCAM humana a la cadena α -4 de la laminina de la siguiente manera. Las células CHO que expresan MCAM humana se incubaron con un anticuerpo anti-MCAM humana (a diversas concentraciones) durante 30 minutos a 4 grados centígrados. Se lavó el anticuerpo sin unir y las células se incubaron con laminina 411 humana recombinante a 20 μ g/ml durante 45 minutos a 37 grados centígrados. La laminina sin unir se eliminó mediante lavado, y la laminina unida a la superficie de las células se detectó con anticuerpos anti-laminina marcados con fluorescencia. Después del lavado, la cantidad de laminina unida a la superficie se detectó mediante citometría de flujo, y las CI50s se calcularon en función de la intensidad fluorescente media.

Utilizando el ensayo descrito anteriormente, se identificaron seis clones de anticuerpos monoclonales anti-MCAM humana con unión a MCAM humana y que tenían la mayor capacidad de bloquear la interacción entre la MCAM humana expresada en la superficie de las células y su ligando de unión, laminina humana 411. Estos seis clones de anticuerpos monoclonales anti-MCAM se mencionan aquí como (i) los clones monoclonales anti-MCAM humana de ratón 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, y 1749.1.3, y (ii) los clones de anticuerpos monoclonales anti-MCAM humana de rata 2120.4.19 y 2107.4.10. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de las cadenas pesada y ligera de estos anticuerpos, y sus regiones hipervariables, se proporcionan en las SEQ ID N^o: 29-92. Más específicamente, en el ensayo anterior, se determinó que las CI50s para los clones de anticuerpos monoclonales 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19 y 2107.4.10 son 0,469 μ g/ml, 0,431 μ g/ml, 0,307 μ g/ml, 0,545 μ g/ml, 0,888 μ g/ml y 0,290 μ g/ml, respectivamente. Además, los experimentos realizados para determinar la afinidad de unión específica de cada anticuerpo monoclonal demostraron que cada uno fue capaz de unirse a la proteína MCAM humana con alta afinidad (datos no mostrados). Como tales, cada uno de estos anticuerpos monoclonales específicos fue muy capaz de unirse a la MCAM humana e inhibir la interacción de la MCAM humana expresada en células con su ligando de unión a laminina α -4. En contraste, dos anticuerpos de control, un anticuerpo IgG1 humano inespecífico y un anticuerpo anti-MCAM completamente humano descrito anteriormente denominado ABX-MA1 (por ejemplo, véase Mills et al., Cancer Res. 62: 5106 (2002), y las patentes de EE. UU. N^os 6.924.360, 7.067.131 y 7.090.844) fueron incapaces de bloquear la interacción de la unión entre la MCAM humana y su molécula de unión, laminina 411.

Como tales, los seis anticuerpos monoclonales específicos identificados anteriormente poseen la nueva capacidad de (i) unirse con alta afinidad a MCAM humana en la superficie de las células vivas, y (ii) bloquear la interacción de MCAM humana expresada en las células con una proteína de laminina que comprende una cadena polipeptídica de laminina α -4.

Ejemplo 3. Análisis de la unión de dominios para los anticuerpos monoclonales anti-MCAM

Se empleó el análisis de ForteBio para determinar la ubicación del epítipo del antígeno en la proteína MCAM humana que reconocen y a la que se unen los clones de anticuerpos monoclonales 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19 y 2107.4.10. Se usó el siguiente protocolo: se utilizaron biosensores de ForteBio de Fc anti-IgG humana para inmovilizar varios dominios de MCAMhFc, incluida la proteína MCAMhFc de longitud completa en la superficie del biosensor. Estos sensores se sumergieron en los anticuerpos específicos de MCAM 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19 o 2107.4.10 para la detección de la unión a estos dominios o a la proteína de longitud completa. Después de cargar estas muestras en una placa negra de 96 pocillos, el Octet Red se programó de la siguiente manera: 60 segundos para el valor inicial n^o 1; 180 segundos para cargar varios dominios; 60 segundos para el valor inicial n^o 2; 180 segundos para la asociación del anticuerpo al dominio; y 240 segundos para la disociación del anticuerpo del dominio.

45 Reactivos y suministros utilizados:

1. Concentración final de MCAMhFc a 5 μ g/ml
2. clones de anticuerpos 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19 y 2107.4.10 a 5 μ g/ml
3. Biosensores de captura de Fc anti-IgG humana (AHC) de ForteBio para experimentos de cinética, n^o de cat. 18-5060
4. Bloque de placas de 96 pocillos de Greiner Bio-one, n^o de cat. 655209
5. Aparato ForteBio Octet Red
6. Se usó un medio de cultivo de tejidos fresco, DMEM con 20% de FCS, como tampón para la dilución

Los resultados de estos análisis son los siguientes.

Se demostró que todos los clones de anticuerpos monoclonales 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1 y 1749.1.3 se unen a un

epítipo antigénico hallado en el dominio 3 de la proteína MCAM humana, definido específicamente por los aminoácidos 244-321 (SEQ ID N°: 24) de la proteína MCAM humana. Estos anticuerpos monoclonales no fueron capaces de unirse al dominio 1 de MCAM humana (concretamente, los aminoácidos 19-129, SEQ ID N°: 22), el dominio 2 (concretamente, los aminoácidos 139-242, SEQ ID N°: 23), o la combinación de dominios 1 y 2 (concretamente, los aminoácidos 19-242). Por lo tanto, los clones de anticuerpos monoclonales 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1 y 1749.1.3 definen un nuevo epítipo antigénico localizado dentro del dominio 3 de la proteína MCAM humana.

Se demostró que los clones de anticuerpos monoclonales 2120.4.19 y 2107.4.10 se unen a un epítipo antigénico definido por la combinación de los dominios 1 de MCAM humana (concretamente, los aminoácidos 19-129, SEQ ID N°: 22), y el dominio 2 (concretamente, los aminoácidos 139-242, SEQ ID N°: 23). Ninguno de estos dos anticuerpos monoclonales se unió al dominio 1 de MCAM humana por sí mismo. Por lo tanto, los clones de anticuerpos monoclonales 2120.4.19 y 2107.4.10 definen un nuevo epítipo antigénico determinado por la presencia de ambos dominios 1 y 2 de la proteína MCAM humana.

En contraste con lo anterior, el anticuerpo ABX-MA1 anti-MCAM completamente humano descrito previamente se une a un epítipo antigénico diferente de los descritos anteriormente, concretamente, un epítipo antigénico que está completamente definido y abarcado solamente dentro del dominio 1 de MCAM humana.

Dados estos resultados, debido a que cada uno de los clones de anticuerpos monoclonales 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19 y 2107.4.10 son capaces de (i) unirse a la MCAM humana, y (ii) bloquear la interacción entre la MCAM humana y una proteína que contiene laminina α -4, mientras que el anticuerpo ABX-MA1 es capaz de unirse solo a la MCAM humana, pero no bloquear la interacción entre la MCAM humana y una proteína que contiene laminina α -4, estos resultados demuestran que el dominio 2 de MCAM humana, el dominio 3 de MCAM humana y su combinación desempeñan un papel en la interacción de unión con la cadena de laminina α -4. Teniendo en cuenta esto, está claro que los anticuerpos que se unen al dominio 2 de MCAM humana, el dominio 3 de MCAM humana y/o la combinación de los mismos tendrán utilidad como agentes capaces de bloquear la interacción entre la MCAM humana y la laminina α -4 y, por lo tanto, tendrán utilidad para inhibir las diversas consecuencias descritas en la presente memoria que resultan de esa interacción. En contraste, los anticuerpos que se unen a un epítipo antigénico definido únicamente por el dominio 1 de MCAM humana (como el anticuerpo ABX-MA1 descrito en la presente memoria) no son útiles para bloquear la interacción MCAM/laminina α -4 y sus diversas consecuencias biológicas posteriores.

Ejemplo 4. Cartografía de epítopos mediante mutagénesis aleatoria

Se identificaron varios residuos de aminoácidos de interés para la unión del anticuerpo anti-MCAM utilizando mutagénesis aleatoria y tecnología de expresión celular de alto rendimiento que permite la expresión y el análisis de grandes bibliotecas de proteínas objetivo mutadas dentro de células eucarióticas. Cada residuo de la proteína MCAM humana se mutó individualmente a una alanina, u otro residuo específico, para analizar los cambios en la función. Las proteínas se expresaron en líneas celulares de mamífero habituales.

La Tabla 1 muestra un resumen de los reactivos y métodos utilizados para generar la biblioteca de mutagénesis aleatoria.

Tabla 1

Plásmido original	hsMCAM-V5/HIS6 (n° de acceso NP 006491)
Tamaño final de la biblioteca	528 clones mutantes más 17 mutantes adicionales por mutagénesis dirigida
Estrategia de mutación	Mutagénesis de barrido de alaninas
Tipo de célula	BHK-S
Etiqueta de epítipo	V5/HIS6 C-terminal

La MCAM humana de longitud completa se sometió a optimización de codones, se sintetizó y se subclonó con éxito en un vector de alta expresión en mamíferos. En esta construcción original se verificó después la secuencia y se validó para la expresión en células mamíferas mediante métodos de inmunodetección.

La detección del anticuerpo 1749.1.3 y los sueros de ratón que se unieron a MCAM mediante inmunofluorescencia se optimizó con éxito para el formato de alto rendimiento de mutagénesis aleatoria. Las diluciones en serie de cada anticuerpo primario se ensayaron con una sola dilución de anticuerpo secundario en un formato de 384 pocillos. Los anticuerpos se ensayaron con respecto a la detección de células 293T y BHK que expresaban MCAM humana. Se seleccionaron las condiciones de ensayo óptimas para cribar la biblioteca de mutación completa.

Se creó la biblioteca de mutaciones de MCAM y se verificó la secuencia, que consistió en 545 clones (528/536 mutantes de alanina y 17/17 mutantes mediante mutagénesis dirigida), cada uno de los cuales tenía una única sustitución de residuo por alanina (los residuos de alanina se sustituyen por serina) o un residuo especificado. Los residuos 35, 66, 161, 261, 342, 380, 414 y 435 no están representados en la biblioteca. La biblioteca de mutaciones

ES 2 744 526 T3

se cribó por triplicado mediante inmunodetección en función de la unión a sueros de ratón. Esto valida la expresión en la superficie celular para cada clon mutante.

Se realizaron múltiples rondas de optimización para determinar las condiciones que son adecuadas para la cartografía. Se evaluaron las siguientes variables: múltiples concentraciones de laminina y concentraciones de anticuerpos secundarios anti-laminina, varios tampones de bloqueo para reducir la unión inespecífica, múltiples tipos de células y múltiples etapas de lavado.

5

La biblioteca de mutaciones se cribó por triplicado mediante inmunodetección en función de la unión al anticuerpo 1749.1.3. Se cuantificó la reactividad para cada mutante para identificar los mutantes puntuales que exhiben una pérdida de unión.

10 El anticuerpo monoclonal y la reactividad de los sueros se cuantificaron para cada clon mutante para identificar los mutantes puntuales que exhiben una pérdida de unión sin afectar a la expresión en la superficie. Se identificaron los residuos críticos para cada anticuerpo mediante la comparación del perfil de unión del anticuerpo monoclonal con el perfil de unión de los sueros de cada clon mutante.

15 Las células BHK se transfectaron con MCAM de tipo natural (TN) o vector solo en un formato de 384 pocillos, seguido de inmunodetección. Se analizaron diluciones en serie de cada anticuerpo (comenzando con 4 µg/ml) para determinar la inmunorreactividad contra TN o vector solo (Tabla 2). Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones.

Tabla 2

Ab primario (µg/mL)	MAb 1749.1.3		Sueros de EM		Conc. de los Sueros de EM (µg/mL)
	S/B	Z'	S/B	Z'	
4,00	13,11	0,69	6,49	0,19	1:100
2,00	27,98	0,58	7,69	0,53	1:200
1,00	27,92	0,76	8,32	0,74	1:400
0,50	40,47	0,68	7,91	0,55	1:800
0,25	33,53	0,72	11,65	0,50	1:1600
0,13	29,95	0,79	16,29	0,50	1:3200
0,06	18,22	0,34	10,87	0,54	1:6400
0,03	10,41	0,62	10,22	0,39	1:12800
0,02	4,91	0,79	7,29	-0,19	1:25600
0,00	0,31	-4,83	1,77	-5,95	0,00

20 Se determinaron las condiciones de cribado óptimas para la inmunodetección y la cartografía de epítomos de 1749.1.3 y sueros de EM. Usando estas condiciones, cada anticuerpo demostró una señal robusta, valores altos de señal respecto del fondo, y una baja variabilidad entre duplicados. Estos datos indican que estas condiciones son adecuadas para la cartografía de epítomos de alto rendimiento eficaz. Se usaron concentraciones finales de cribado de 0,5 µg/mL para 1749.1.3 y una dilución 1:800 de los sueros de EM. Se utilizaron anticuerpos secundarios de Jackson ImmunoResearch a 1:400 para la detección de MAb y sueros. La Tabla 3 muestra los parámetros experimentales optimizados para la inmunodetección de alto rendimiento.

25

Tabla 3

Parámetro experimental	MAB 1749.1.3	Sueros de EM
Fijador de células	BHK-S 4% PFA	BHK-S 4% PFA
Tampón de bloqueo	10% de suero de cabra	10% de suero de cabra
Ab primario	1749	Sueros
Nombre del objetivo del Ab	MCAM	MCAM
Conc. óptima incubación (TA)	0,5 µg/ml 60 min	Dilución 1:800 60 min
Objetivo secundario del Ab	IgG de ratón	IgG de ratón
Conc. óptima Incubación	1:400 (3,75 µg/ml)	1:400 (3,75 µg/ml)
Fabricante	30 min	30 min
Nº de cat.	Jackson/ImmunoResearch 115-545-003	Jackson/ImmunoResearch 115-545-003
ID del anticuerpo	Anti-IgG de ratón de cabra Alexa Fluor® 488-AffiniPure (H+L)	Anti-IgG de ratón de cabra Alexa Fluor® 488-AffiniPure (H+L)
Lavados	PBS (sin Ca ²⁺ , Mg ²⁺) 40:1	PBS (sin Ca ²⁺ , Mg ²⁺) 8:1
Señal:fondo		

- 5 La biblioteca de mutaciones se analizó para determinar la expresión en la superficie (unión de los sueros de ratón) y la unión del anticuerpo monoclonal, por triplicado. A cada punto de datos en bruto se le restó el fondo y se normalizó respecto de los valores de reactividad de MCAM de tipo natural. Los resultados se muestran en la Fig. 1. El valor medio de unión del anticuerpo monoclonal para cada clon se representa en función de su valor medio de expresión en la superficie (Fig. 1, rombos grises). Se aplicaron umbrales de <30% de reactividad de anticuerpos monoclonales y >50% de unión de sueros de ratón para identificar los clones (Fig. 1, rombos negros) que fueron negativos para la unión de anticuerpos monoclonales, pero positivos para la expresión en la superficie.
- 10 Los residuos críticos para 1749.1.3 se identificaron mediante la evaluación de la reactividad media de los anticuerpos monoclonales de cada clon en comparación con su expresión total en la superficie (reactividad media del suero). Los residuos involucrados en la unión del anticuerpo se identificaron como aquellos que fueron negativos para la unión del anticuerpo monoclonal (<30% TN), pero positivos para la expresión en la superficie (> 50% TN) (Tabla 4). Se determinó la reactividad media (y la desviación estándar) para cada residuo crítico.

15 Tabla 4.

ID de residuo	Mutaciones	MAB 1749.1.3	Sueros de EM
272	C272A	7,6 (4,7)	54,5 (55,8)
318	Y318A	7,1 (2,4)	111,7 (9,2)
320	C320A	9,3 (11,2)	50 (54,6)
340	V340A	8,7 (8,3)	103,8 (71,3)
377	W377A	13,7 (10,3)	63,4 (18,9)

- Los aminoácidos críticos identificados mediante la cartografía de mutagénesis aleatoria sugieren los sitios de unión para el anticuerpo 1749.1.3. Los datos indican que 1749.1.3 se une a un epítipo conformacionalmente complejo en el tercer dominio de Ig de MCAM.
- 20 Los residuos críticos parecen depender en gran medida de la estabilización estructural aportada por los enlaces disulfuro del segundo y/o tercer dominios de Ig. La mutación en la cisteína 272 o 320 anula la unión del anticuerpo, lo que sugiere que el enlace disulfuro compartido del tercer dominio de Ig juega un papel importante en la estabilización del epítipo.

Ejemplo 5 Cartografía confirmatoria de epítipos de MCAM para la unión a anticuerpos y laminina

- 25 Para identificar los sitios de unión de 1749.1.3 en MCAM humana, se construyó un modelo de homología de Ig3 de MCAM humana en pdb 3KVQ_A, 3V2A_R, 2IEP_A y 2YD1_A usando el programa Schrodinger Maestro (Fig. 2). Se diseñaron y generaron veinte mutantes puntuales basados en la información de la estructura y la información de la mutagénesis aleatoria. Estos mutantes se expresaron en células mamíferas, y se usó FACS para ensayar la unión de 1749.1.3 y laminina α -4 a los mutantes de MCAM. Tres mutantes únicos de MCAM, I141A, D216A e Y318A,

demonstraron una pérdida completa de la unión a laminina α -4. El mutante Y318A demostró una pérdida completa de la unión a 1749.1.3.

5 Para confirmar aún más los datos, se generaron líneas celulares estables que expresaban I141A, P145V, D216A e Y318A, respectivamente. Los ensayos de ForteBio se realizaron con las proteínas purificadas como se describió anteriormente. El anticuerpo ABX-MA1 de control se unió a MCAM de tipo natural y a los mutantes de MCAM. El anticuerpo 1749.1.3 no mostró una unión significativa al mutante Y318A de MCAM.

Ejemplo 6. Humanización de anticuerpos 1749.1.3.

10 El punto de partida o anticuerpo donante para la humanización es el anticuerpo de ratón 1749 producido mediante un hibridoma descrito en los documentos WO/2012/170071 y PCT/US2013/058773. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región variable madura de la cadena pesada de m1749 se proporcionan como SEQ ID N°s: 93 y 64, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región variable madura de la cadena ligera de m1749 maduro se proporcionan como SEQ ID N°s: 97 y 59, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada se proporcionan como SEQ ID N°s: 66, 67 y 68, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera se proporcionan como SEQ ID N°s: 61, 62 y 63, respectivamente. En este Ejemplo se utiliza la numeración de Kabat.

15 La región variable kappa (Vk) de m1749 pertenece al subgrupo 1 de Kabat de ratón, que corresponde al subgrupo 4 de Kabat humano. La región variable pesada (Vh) de m1749 pertenece al subgrupo 3d de Kabat de ratón, que corresponde al subgrupo 3 de Kabat humano (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición). Publicación del NIH N° 91-3242, 1991). La CDR-L1 de 17 residuos pertenece a la clase canónica 3, la CDR-L2 de 7 residuos pertenece a la clase canónica 1, la CDR-L3 de 8 residuos pertenece a la clase canónica 3 de Vk (Martin y Thornton, J Mol Biol. 263: 800-15, 1996). La CDR-H1 de 5 residuos pertenece a la clase canónica 1, la CDR-H2 de 17 residuos pertenece a la clase canónica 1 o 3 (Martin y Thornton, J Mol Biol. 263: 800-15, 1996). La CDR-H3 no tiene clases canónicas, pero el bucle de 11 residuos probablemente tiene una base retorcida de acuerdo con las reglas de Shirai et al., FEBS Lett. 455: 188-97 (1999).

20 Los residuos en la interfase entre los dominios Vk y Vh son los que se encuentran comúnmente. Se realizó una búsqueda a lo largo de las secuencias de proteínas en la base de datos de PDB (Deshpande et al., Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005) para encontrar estructuras que proporcionasen un modelo estructural aproximado de 1749. El anticuerpo contra la proteína de membrana integral DsbB en *E. coli*, debido a que posee una buena similitud de secuencia global con Vk de m1749, conserva las mismas estructuras canónicas para los bucles. La estructura cristalina de rayos X del anticuerpo anti-DsbB (código pdb 2LTQ; Tang et al., J. Mol. Biol. 425: 1670-82, 2013; SEQ ID N°: 161) se usó para la estructura Vk en la modelización. El anticuerpo dirigido contra un inmunógeno peptídico de la hemaglutinina del virus de la gripe tiene una buena similitud de secuencia global con la estructura de Vh de 1749. También tiene una CDR-H3 de una longitud similar con una base retorcida. La estructura del anticuerpo dirigido contra un inmunógeno peptídico de la hemaglutinina del virus de la gripe (1H1L; Rini et al., Science 255: 959-65, 1992; SEQ ID N°: 157) tiene una resolución razonable (2.0 Å), y se usó para la estructura de Vh en la modelización. Además, las CDRs-H1 y H2 de 1H1L tienen las mismas estructuras canónicas para CDR-H1 y CDR-H2 que las de Vh de 1749. Se utilizó BioLuminate® para modelizar una estructura aproximada de 1749Fv.

30 Una búsqueda en la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes del NCBI permitió la selección de estructuras humanas adecuadas en las que injertar las CDRs murinas. Para Vk, se eligieron dos cadenas ligeras kappa humanas, la primera con el código de acceso NCBI ABA71407.1 (GI: 77379502; SEQ ID N°: 162) (Manske et al., Clin. J. Immunol. 120: 106-20, 2006) y la segunda con el código de acceso NCBI CAI99800.1 (GI: 98956324; SEQ ID N°: 163) (Su et al., J. Immunol. 181: 1264-71, 2008). Esto tiene las mismas clases canónicas para CDR-L1, L2 y L3. ABA71407.1 tiene una identidad de secuencia del 85% en la región estructural de la región variable de la cadena ligera respecto de la cadena ligera de 1749 murino. CAI99800.1 tiene una identidad de secuencia del 83% en la región estructural de la región variable de la cadena ligera respecto de la cadena ligera de 1749 murino.

35 Para Vh, se eligieron dos cadenas pesadas de Ig humana, la primera con el código de acceso NCBI AAX82494.1 (GI: 62421461; SEQ ID N°: 158) (Lundquist, Infect. Immun. 74: 3222-31, 2006) y la segunda con el código de acceso de NCBI ADX65676.1 (GI: 323432073; SEQ ID N°: 159) (sin publicar). Comparte la forma canónica de CDR-H1 y H2 de 1749, y H3 tiene una longitud de 11 residuos con una base retorcida predicha. AAX82494.1 tiene una identidad de secuencia del 91% en la región estructural de la región variable respecto de la cadena pesada de 1749 murino. ADX65676.1 tiene una identidad de secuencia del 83% en la región estructural de la región variable respecto de la cadena pesada de 1749 murino.

40 Se construyó una variante de la región variable de la cadena ligera humanizada y una variante de la región variable de la cadena pesada humanizada que contenían las sustituciones anteriores (Hu1749VHv3; SEQ ID N°: 156 y Hu1749VLv3; SEQ ID N°: 160) (Figs. 3A y B). Los aminoácidos en H3, H42, H93, L9, L19, L43 de Hu1749VHv3 y Hu1749VLv3 se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5

Numeración de Kabat de algunos residuos estructurales para la retromutación en anticuerpos 1749 humanizados

Residuo de Kabat nº	Residuo Lineal nº	Cadena ligera de ABA71407.1	Cadena ligera de CA199800.1	Cadena pesada de AAX82494.1	Cadena pesada de ADX65 676.1	1749 de ratón	Hu1749VLv3	Hu1749VHv3
H3	3	-	-	Q	Q	K	-	K
H42	42	-	-	D	G	E	-	E
H93	97	-	-	A	A	T	-	T
L9	9	D	D	-	-	S	S	-
L19	19	A	A	-	-	V	V	-
L43	49	P	P	-	-	S	S	-

Las razones para la selección de las posiciones anteriores como candidatos para la sustitución son las siguientes.

5 Q3K (aquí como en cualquier otra parte de la presente memoria para las retromutaciones de la región estructural, el primer residuo mencionado es el residuo humano y el segundo el residuo de ratón): K entra en contacto con Y102 en CDRH3. Por lo tanto, debería mantenerse en la región estructural.

G42E: E tiene una cadena lateral similar a D en el aceptor humano AAX82494.1. E es más frecuente que D en humanos. Esta retromutación contribuye a la estabilidad de la proteína.

10 A93T: Esta posición es un residuo de la interfase Vk/Vh.

D9S: este residuo no entra en contacto ni afecta a las CDRs y/o la interfase. La frecuencia de S es mayor que D en las regiones estructurales humanas.

A19V: La frecuencia de V y A son similares en las regiones estructurales humanas.

15 P43S: S entra en contacto con dos residuos de la interfase en VH: Y91 y W103. Por lo tanto, es crucial, y debería mantenerse en la región estructural.

> Hu1749VHv3

EVKLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVROTPEKRLEWVATISSGGSSTY
YDPSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCTRDDDYDVKVFAYWGQTLV

TVSS

20 > Hu1749VLv3

DIVMTOSPSSLAVSLGERVTINCKSSRLLNSRIRKNYLAWYOOKPGOSPILLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLOAEDVAVYYCKQSYNLLTFGOGTKVEIKR

Ejemplo 7. Caracterización de la variante del anticuerpo 1749H3L3 humanizado

25 Se ha caracterizado la cinética de unión del anticuerpo 1749 humanizado que comprende la cadena pesada Hu1749VHv3 y la cadena ligera Hu1749VLv3.

30 La cinética de unión de los anticuerpos 1749 humanizados se midió mediante interferometría de biocapa (BLI) utilizando un instrumento ForteBio Octet QK (ForteBio, Menlo Park, CA). Se determinaron los parámetros cinéticos de unión detallados (velocidad de asociación, k_a aparente, velocidad de disociación, k_d aparente y constante de afinidad, K_D aparente) para los anticuerpos 1749 quimérico y 1749 humanizado (Tabla 6). La k_a aparente, k_d aparente y K_D aparente son parámetros cinéticos de unión obtenidos utilizando los formatos de ensayo de ForteBio.

Se descubrió que la variante hu1749H3L3 da la constante de disociación más baja (la constante de asociación más alta), lo mismo que 1749.1.3 dentro del EEM.

Tabla 6

Parámetros cinéticos de unión de los anticuerpos 1749 murino, 1749 quimérico y 1749 humanizado			
Anticuerpo	K _D aparente M	K _a aparente (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d aparente (s ⁻¹)
1749 de ratón	2,86E-10	1,41E+6	4,02E-04
1749 quimérico	2,26E-10	1,94E+6	4,39E-04
1749VH3VL3 humano (Hu1749VHv3 y Hu1749VLv3)	2,21E-10	1,99E+6	4,40E-04

5 Además, el análisis con dispersión dinámica de luz (DLS) muestra un nivel de polidispersidad (% PD) del anticuerpo h1749H3L3 similar al del anticuerpo m1749 original (Tabla 7). Las medidas de dispersión dinámica de luz se tomaron en un instrumento de dispersión dinámica de luz Wyatt DynaPro Nanostar, en volúmenes de 10 microlitros en una cubeta de cuarzo. Todas las mediciones se obtuvieron a 37 °C, y cada medición tuvo 10 adquisiciones con un tiempo de adquisición de 5 segundos. La regularización se realizó mediante el programa informático Wyatt Technology Dynamics 7.0 utilizando un modelo de esferas de Rayleigh.

Tabla 7

Análisis mediante DLS de variantes de 1749	
mAb	% Pd
h1749 TN	68,8
h1749 P43S	64,6
m1749	10,2
ch1749	19,6
h1749H3L3	22,0

10

Sequence listing

<110> LIU, Yue

<120> ANTICUERPOS ANTI-MCAM Y MÉTODOS DE USO ASOCIADOS

<130> 057450/459014

15 <150> US 61/952,123
<151> 12-03-2014

<150> US 62/023,698
<151> 11-07-2014

20 <150> US 62/068,438
<151> 24-10-2014

<160> 179

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 428

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 1

ES 2 744 526 T3

```

atgagggtcc agattcagtt tctggggctc cttctgctct ggacatcagt tgtccagtg 60
gatgtccaga tgaccagtc tccatcttat cttgctacgt ctctggaga gagggtttcc 120
atcagttgca aggcaagtaa aaacattgac acatacttag cctggatca ggagaaacct 180
gggaaaacga ataagcttct tatctactct gggtcaactt tgcaatctgg aactccatcg 240
agattcagtg gcagtggatc tggtagacat ttcacgctca ccatcagaaa cctggagtct 300
gaagattht g cagtctacta ctgtcaacag cataatgaat acccgctcac gttcggttct 360
gggaccaagc tggagatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
tcctcggga 428

```

<210> 2

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 2

```

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

```

10

```

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

```

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 3

```

Lys Ala Ser Lys Asn Ile Asp Thr Tyr Leu Ala
 1          5          10

```

20

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Sintético

<400> 4

```

Ser Gly Ser Thr Leu
 1          5

```

<210> 5

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

ES 2 744 526 T3

<400> 5
 Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 480
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 6
 atggacacca ggctctgctt ggttttcctt gtccttttca taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg tggaggctta gtgcagcctg gaaggtcctt gaaactctcc 120
 tgtgcagcct caggattcac tttcagtaac tattacatgg cctgggtccg ccaggctcca 180
 acgaagggtc tggagtgggt cgcatccatt agttttgagg gtaatagaaa tcactatgga 240
 gactccgtga agggccgaat cactatctcc agagataatg caaaaagcac cctatacctg 300
 caaatgacca gtctgaggcc tgaggacacg gcctattatt gtgcaagaca tcgggggtat 360
 agtacgaatt tttatcacga cgttttggat gcctggggtc aaggagcttt agtcaactgtc 420
 tcctcagctg aaacaacagc cccatctgtc tatccactgg ctcttgaac tgctctcaaa 480

<210> 7
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 7
 Met Asp Thr Arg Leu Cys Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Phe Glu Gly Asn Arg Asn His Tyr Gly
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Tyr Ser Thr Asn Phe Tyr His Asp
 115 120 125
 Val Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 Glu Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu
 145 150 155 160
 Lys

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 8
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Tyr Met Ala
 1 5 10

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial quence

<220>
<223> Sintético

<400> 9
Ser Ile Ser Phe Glu Gly Asn Arg Asn His Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 <210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 10
His Arg Gly Tyr Ser Thr Asn Phe Tyr His Asp Val Leu Asp Ala Trp
1 5 10 15
Gly Gln Gly

15 <210> 11
<211> 646
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Met Gly Leu Pro Arg Leu Val Cys Ala Phe Leu Leu Ala Ala Cys Cys
1 5 10 15
Cys Cys Pro Arg Val Ala Gly Val Pro Gly Glu Ala Glu Gln Pro Ala
20 25 30
Pro Glu Leu Val Glu Val Glu Val Gly Ser Thr Ala Leu Leu Lys Cys
35 40 45
Gly Leu Ser Gln Ser Gln Gly Asn Leu Ser His Val Asp Trp Phe Ser
50 55 60
Val His Lys Glu Lys Arg Thr Leu Ile Phe Arg Val Arg Gln Gly Gln
65 70 75 80
Gly Gln Ser Glu Pro Gly Glu Tyr Glu Gln Arg Leu Ser Leu Gln Asp
85 90 95
Arg Gly Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gln Val Thr Pro Gln Asp Glu Arg
100 105 110
Ile Phe Leu Cys Gln Gly Lys Arg Pro Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile
115 120 125
Gln Leu Arg Val Tyr Lys Ala Pro Glu Glu Pro Asn Ile Gln Val Asn
130 135 140
Pro Leu Gly Ile Pro Val Asn Ser Lys Glu Pro Glu Glu Val Ala Thr
145 150 155 160
Cys Val Gly Arg Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Gln Val Ile Trp Tyr Lys
165 170 175
Asn Gly Arg Pro Leu Lys Glu Glu Lys Asn Arg Val His Ile Gln Ser
180 185 190
Ser Gln Thr Val Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Gln Ser Ile Leu
195 200 205
Lys Ala Gln Leu Val Lys Glu Asp Lys Asp Ala Gln Phe Tyr Cys Glu
210 215 220
Leu Asn Tyr Arg Leu Pro Ser Gly Asn His Met Lys Glu Ser Arg Glu
225 230 235 240
Val Thr Val Pro Val Phe Tyr Pro Thr Glu Lys Val Trp Leu Glu Val
245 250 255
Glu Pro Val Gly Met Leu Lys Glu Gly Asp Arg Val Glu Ile Arg Cys
260 265 270
Leu Ala Asp Gly Asn Pro Pro Pro His Phe Ser Ile Ser Lys Gln Asn
275 280 285
Pro Ser Thr Arg Glu Ala Glu Glu Glu Thr Thr Asn Asp Asn Gly Val
290 295 300
Leu Val Leu Glu Pro Ala Arg Lys Glu His Ser Gly Arg Tyr Glu Cys
305 310 315 320
Gln Ala Trp Asn Leu Asp Thr Met Ile Ser Leu Leu Ser Glu Pro Gln
325 330 335
Glu Leu Leu Val Asn Tyr Val Ser Asp Val Arg Val Ser Pro Ala Ala

ES 2 744 526 T3

			340					345				350			
Pro	Glu	Arg	Gln	Glu	Gly	Ser	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Glu
			355					360				365			
Ser	Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Phe	Gln	Trp	Leu	Arg	Glu	Glu	Thr	Asp	Gln
			370				375					380			
Val	Leu	Glu	Arg	Gly	Pro	Val	Leu	Gln	Leu	His	Asp	Leu	Lys	Arg	Glu
385					390					395					400
Ala	Gly	Gly	Gly	Tyr	Arg	Cys	Val	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Gly
				405					410					415	
Leu	Asn	Arg	Thr	Gln	Leu	Val	Lys	Leu	Ala	Ile	Phe	Gly	Pro	Pro	Trp
			420					425					430		
Met	Ala	Phe	Lys	Glu	Arg	Lys	Val	Trp	Val	Lys	Glu	Asn	Met	Val	Leu
			435				440					445			
Asn	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	His	Pro	Arg	Pro	Thr	Ile	Ser	Trp
			450			455					460				
Asn	Val	Asn	Gly	Thr	Ala	Ser	Glu	Gln	Asp	Gln	Asp	Pro	Gln	Arg	Val
465					470					475					480
Leu	Ser	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Pro	Glu	Leu	Leu	Glu	Thr	Gly
				485					490					495	
Val	Glu	Cys	Thr	Ala	Ser	Asn	Asp	Leu	Gly	Lys	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu
			500					505						510	
Phe	Leu	Glu	Leu	Val	Asn	Leu	Thr	Thr	Leu	Thr	Pro	Asp	Ser	Asn	Thr
			515				520					525			
Thr	Thr	Gly	Leu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	His	Thr	Arg	Ala	Asn
			530			535					540				
Ser	Thr	Ser	Thr	Glu	Arg	Lys	Leu	Pro	Glu	Pro	Glu	Ser	Arg	Gly	Val
545					550					555					560
Val	Ile	Val	Ala	Val	Ile	Val	Cys	Ile	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Leu	Gly
				565					570					575	
Ala	Val	Leu	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Lys	Lys	Gly	Lys	Leu	Pro	Cys	Arg	Arg
			580					585					590		
Ser	Gly	Lys	Gln	Glu	Ile	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Lys	Thr	Glu	Leu
			595				600					605			
Val	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Asp	Lys	Leu	Pro	Glu	Glu	Met	Gly	Leu	Leu
			610			615					620				
Gln	Gly	Ser	Ser	Gly	Asp	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Asp	Gln	Gly	Glu	Lys
625					630					635					640
Tyr	Ile	Asp	Leu	Arg	His										
				645											

<210> 12

<211> 474

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 12

```

atggaatcac agaccaggt cctcatgtcc ctgctgctct ggatttctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgaccagtc tccatcctct ctggctgtgt cagctgggga gacgtctct 120
atacactgca agtccagtc gagtcttita tacagtggaa cccaaaagaa ctacttgcc 180
tggttccagc agaaaccagg acagtctcct aaactgctga tcttctggc atctactagg 240
cagtctggtg tccctgatcg cttcataggc cgtggatctg ggacagactt cactctgacc 300
atcagcggtg tgcaggcaga agatctggca atttattact gtcaacaata ttatgatact 360
ctcacggaca cgtttggagc ggggaccaag ctggaactga aacgggctga tgctgcacca 420
actgtatcta tcttcccacc atccacggaa cagttagcaa ctggaggtgc ctca 474

```

10 <210> 13

<211> 158

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintetizado

<400> 13

ES 2 744 526 T3

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

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Thr Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

10 <210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 15

Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser
 1 5

<210> 16

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 16

Gln Gln Tyr Tyr Asp Thr Leu Thr Asp Thr
 25 1 5 10

<210> 17

<211> 469

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Sintético

<400> 17

ES 2 744 526 T3

```

atggacatca ggctcagctt ggctttcctg gtccttttca taaaagggtg ccagtgtgag 60
gtgcggctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaagtccat gaaactctcc 120
tgtgtagcct cgggattcaa attcagtaac tattacatgt cctgggtccg ccaggctcca 180
gcgaagggtc tggagtgggt cgcattccatt agtgatgggt gtggtgacac tttctgtcga 240
gacttgggga agggccgatt cactatctcc agagataatg caaaaagtac cttttacctg 300
caaatggaca gtctgaggcc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaag acggggagca 360
gctatggggg gtgttatgga tgcttggggg caaggaactt cagtcactgt ctcctcagct 420
gaaacaacag ccccatctgt ctatccactg gctcctggaa ctgctctca 469

```

<210> 18

<211> 156

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 18

```

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

```

10 <210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 19

Gly Phe Lys Phe Ser Asn Tyr Tyr Met Ser

1

5

10

20 <210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Sintético

<400> 20

```

Ser Ile Ser Asp Gly Gly Gly Asp Thr Phe Cys Arg Asp Leu Val Lys
 1          5          10          15
Gly

```

<210> 21

<211> 15

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 744 526 T3

<220>
<223> Sintético

<400> 21
Arg Gly Ala Ala Met Gly Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly
1 5 10 15

5 <210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Pro Arg Val Ala Gly Val Pro Gly Glu Ala Glu Gln Pro Ala Pro Glu
1 5 10 15
Leu Val Glu Val Glu Val Gly Ser Thr Ala Leu Leu Lys Cys Gly Leu
20 25 30
Ser Gln Ser Gln Gly Asn Leu Ser His Val Asp Trp Phe Ser Val His
35 40 45
Lys Glu Lys Arg Thr Leu Ile Phe Arg Val Arg Gln Gly Gln Gly Gln
50 55 60
Ser Glu Pro Gly Glu Tyr Glu Gln Arg Leu Ser Leu Gln Asp Arg Gly
65 70 75 80
Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gln Val Thr Pro Gln Asp Glu Arg Ile Phe
85 90 95
Leu Cys Gln Gly Lys Arg Pro Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile Gln
100 105 110

10 <210> 23
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 23
Pro Asn Ile Gln Val Asn Pro Leu Gly Ile Pro Val Asn Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Glu Glu Val Ala Thr Cys Val Gly Arg Asn Gly Tyr Pro Ile Pro
20 25 30
Gln Val Ile Trp Tyr Lys Asn Gly Arg Pro Leu Lys Glu Glu Lys Asn
35 40 45
Arg Val His Ile Gln Ser Ser Gln Thr Val Glu Ser Ser Gly Leu Tyr
50 55 60
Thr Leu Gln Ser Ile Leu Lys Ala Gln Leu Val Lys Glu Asp Lys Asp
65 70 75 80
Ala Gln Phe Tyr Cys Glu Leu Asn Tyr Arg Leu Pro Ser Gly Asn His
85 90 95
Met Lys Glu Ser Arg Glu Val Thr
100

20 <210> 24
<211> 78
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Pro Val Phe Tyr Pro Thr Glu Lys Val Trp Leu Glu Val Glu Pro Val
1 5 10 15
Gly Met Leu Lys Glu Gly Asp Arg Val Glu Ile Arg Cys Leu Ala Asp
20 25 30
Gly Asn Pro Pro Pro His Phe Ser Ile Ser Lys Gln Asn Pro Ser Thr
35 40 45
Arg Glu Ala Glu Glu Glu Thr Thr Asn Asp Asn Gly Val Leu Val Leu
50 55 60
Glu Pro Ala Arg Lys Glu His Ser Gly Arg Tyr Glu Cys Gln
65 70 75

25 <210> 25
<211> 90
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 744 526 T3

<400> 25

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

<210> 26

<211> 81

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

10

<210> 27

<211> 1823

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 27

ES 2 744 526 T3

Met Ala Leu Ser Ser Ala Trp Arg Ser Val Leu Pro Leu Trp Leu Leu
1 5 10 15
Trp Ser Ala Ala Cys Ser Arg Ala Ala Ser Gly Asp Asp Asn Ala Phe
20 25 30
Pro Phe Asp Ile Glu Gly Ser Ser Ala Val Gly Arg Gln Asp Pro Pro
35 40 45
Glu Thr Ser Glu Pro Arg Val Ala Leu Gly Arg Leu Pro Pro Ala Ala
50 55 60
Glu Lys Cys Asn Ala Gly Phe Phe His Thr Leu Ser Gly Glu Cys Val
65 70 75 80
Pro Cys Asp Cys Asn Gly Asn Ser Asn Glu Cys Leu Asp Gly Ser Gly
85 90 95
Tyr Cys Val His Cys Gln Arg Asn Thr Thr Gly Glu His Cys Glu Lys
100 105 110
Cys Leu Asp Gly Tyr Ile Gly Asp Ser Ile Arg Gly Ala Pro Gln Phe
115 120 125
Cys Gln Pro Cys Pro Cys Pro Leu Pro His Leu Ala Asn Phe Ala Glu
130 135 140
Ser Cys Tyr Arg Lys Asn Gly Ala Val Arg Cys Ile Cys Asn Glu Asn
145 150 155 160
Tyr Ala Gly Pro Asn Cys Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn
165 170 175
Pro Leu Leu Ile Gly Ser Thr Cys Lys Lys Cys Asp Cys Ser Gly Asn
180 185 190
Ser Asp Pro Asn Leu Ile Phe Glu Asp Cys Asp Glu Val Thr Gly Gln
195 200 205
Cys Arg Asn Cys Leu Arg Asn Thr Thr Gly Phe Lys Cys Glu Arg Cys
210 215 220
Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Ala Arg Ile Ala Lys Asn Cys Ala Val
225 230 235 240
Cys Asn Cys Gly Gly Gly Pro Cys Asp Ser Val Thr Gly Glu Cys Leu
245 250 255
Glu Glu Gly Phe Glu Pro Pro Thr Gly Met Asp Cys Pro Thr Ile Ser
260 265 270
Cys Asp Lys Cys Val Trp Asp Leu Thr Asp Asp Leu Arg Leu Ala Ala
275 280 285
Leu Ser Ile Glu Glu Gly Lys Ser Gly Val Leu Ser Val Ser Ser Gly
290 295 300
Ala Ala Ala His Arg His Val Asn Glu Ile Asn Ala Thr Ile Tyr Leu
305 310 315 320
Leu Lys Thr Lys Leu Ser Glu Arg Glu Asn Gln Tyr Ala Leu Arg Lys
325 330 335
Ile Gln Ile Asn Asn Ala Glu Asn Thr Met Lys Ser Leu Leu Ser Asp
340 345 350
Val Glu Glu Leu Val Glu Lys Glu Asn Gln Ala Ser Arg Lys Gly Gln
355 360 365
Leu Val Gln Lys Glu Ser Met Asp Thr Ile Asn His Ala Ser Gln Leu
370 375 380
Val Glu Gln Ala His Asp Met Arg Asp Lys Ile Gln Glu Ile Asn Asn
385 390 395 400
Lys Met Leu Tyr Tyr Gly Glu Glu His Glu Leu Ser Pro Lys Glu Ile

ES 2 744 526 T3

Lys Asp Val Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys Pro Val Ser Ser Trp Pro
 915 920 925
 Ala Tyr Phe Ser Ile Val Lys Ile Glu Arg Val Gly Lys His Gly Lys
 930 935 940
 Val Phe Leu Thr Val Pro Ser Leu Ser Ser Thr Ala Glu Glu Lys Phe
 945 950 955 960
 Ile Lys Lys Gly Glu Phe Ser Gly Asp Asp Ser Leu Leu Asp Leu Asp
 965 970 975
 Pro Glu Asp Thr Val Phe Tyr Val Gly Gly Val Pro Ser Asn Phe Lys
 980 985 990
 Leu Pro Thr Ser Leu Asn Leu Pro Gly Phe Val Gly Cys Leu Glu Leu
 995 1000 1005
 Ala Thr Leu Asn Asn Asp Val Ile Ser Leu Tyr Asn Phe Lys His Ile
 1010 1015 1020
 Tyr Asn Met Asp Pro Ser Thr Ser Val Pro Cys Ala Arg Asp Lys Leu
 1025 1030 1035 1040
 Ala Phe Thr Gln Ser Arg Ala Ala Ser Tyr Phe Phe Asp Gly Ser Gly
 1045 1050 1055
 Tyr Ala Val Val Arg Asp Ile Thr Arg Arg Gly Lys Phe Gly Gln Val
 1060 1065 1070
 Thr Arg Phe Asp Ile Glu Val Arg Thr Pro Ala Asp Asn Gly Leu Ile
 1075 1080 1085
 Leu Leu Met Val Asn Gly Ser Met Phe Phe Arg Leu Glu Met Arg Asn
 1090 1095 1100
 Gly Tyr Leu His Val Phe Tyr Asp Phe Gly Phe Ser Gly Gly Pro Val
 1105 1110 1115 1120
 His Leu Glu Asp Thr Leu Lys Lys Ala Gln Ile Asn Asp Ala Lys Tyr
 1125 1130 1135
 His Glu Ile Ser Ile Ile Tyr His Asn Asp Lys Lys Met Ile Leu Val
 1140 1145 1150
 Val Asp Arg Arg His Val Lys Ser Met Asp Asn Glu Lys Met Lys Ile
 1155 1160 1165
 Pro Phe Thr Asp Ile Tyr Ile Gly Gly Ala Pro Pro Glu Ile Leu Gln
 1170 1175 1180
 Ser Arg Ala Leu Arg Ala His Leu Pro Leu Asp Ile Asn Phe Arg Gly
 1185 1190 1195 1200
 Cys Met Lys Gly Phe Gln Phe Gln Lys Lys Asp Phe Asn Leu Leu Glu
 1205 1210 1215
 Gln Thr Glu Thr Leu Gly Val Gly Tyr Gly Cys Pro Glu Asp Ser Leu
 1220 1225 1230
 Ile Ser Arg Arg Ala Tyr Phe Asn Gly Gln Ser Phe Ile Ala Ser Ile
 1235 1240 1245
 Gln Lys Ile Ser Phe Phe Asp Gly Phe Glu Gly Gly Phe Asn Phe Arg
 1250 1255 1260
 Thr Leu Gln Pro Asn Gly Leu Leu Phe Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Asp
 1265 1270 1275 1280
 Val Phe Ser Ile Ser Leu Asp Asn Gly Thr Val Ile Met Asp Val Lys
 1285 1290 1295
 Gly Ile Lys Val Gln Ser Val Asp Lys Gln Tyr Asn Asp Gly Leu Ser
 1300 1305 1310
 His Phe Val Ile Ser Ser Val Ser Pro Thr Arg Tyr Glu Leu Ile Val
 1315 1320 1325
 Asp Lys Ser Arg Val Gly Ser Lys Asn Pro Thr Lys Gly Lys Ile Glu
 1330 1335 1340
 Gln Thr Gln Ala Ser Glu Lys Lys Phe Tyr Phe Gly Gly Ser Pro Ile
 1345 1350 1355 1360
 Ser Ala Gln Tyr Ala Asn Phe Thr Gly Cys Ile Ser Asn Ala Tyr Phe
 1365 1370 1375
 Thr Arg Val Asp Arg Asp Val Glu Val Glu Asp Phe Gln Arg Tyr Thr
 1380 1385 1390
 Glu Lys Val His Thr Ser Leu Tyr Glu Cys Pro Ile Glu Ser Ser Pro
 1395 1400 1405
 Leu Phe Leu Leu His Lys Lys Gly Lys Asn Leu Ser Lys Pro Lys Ala

ES 2 744 526 T3

Pro Phe Asp Ile Glu Gly Ser Ser Ala Val Gly Arg Gln Asp Pro Pro
 35 40 45
 Glu Thr Ser Glu Pro Arg Val Ala Leu Gly Arg Leu Pro Pro Ala Ala
 50 55 60
 Glu Lys Cys Asn Ala Gly Phe Phe His Thr Leu Ser Gly Glu Cys Val
 65 70 75 80
 Pro Cys Asp Cys Asn Gly Asn Ser Asn Glu Cys Leu Asp Gly Ser Gly
 85 90 95
 Tyr Cys Val His Cys Gln Arg Asn Thr Thr Gly Glu His Cys Glu Lys
 100 105 110
 Cys Leu Asp Gly Tyr Ile Gly Asp Ser Ile Arg Gly Ala Pro Gln Phe
 115 120 125
 Cys Gln Pro Cys Pro Cys Pro Leu Pro His Leu Ala Asn Phe Ala Glu
 130 135 140
 Ser Cys Tyr Arg Lys Asn Gly Ala Val Arg Cys Ile Cys Asn Glu Asn
 145 150 155 160
 Tyr Ala Gly Pro Asn Cys Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn
 165 170 175
 Pro Leu Leu Ile Gly Ser Thr Cys Lys Lys Cys Asp Cys Ser Gly Asn
 180 185 190
 Ser Asp Pro Asn Leu Ile Phe Glu Asp Cys Asp Glu Val Thr Gly Gln
 195 200 205
 Cys Arg Asn Cys Leu Arg Asn Thr Thr Gly Phe Lys Cys Glu Arg Cys
 210 215 220
 Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Ala Arg Ile Ala Lys Asn Cys Ala Val
 225 230 235 240
 Cys Asn Cys Gly Gly Gly Pro Cys Asp Ser Val Thr Gly Glu Cys Leu
 245 250 255
 Glu Glu Gly Phe Glu Pro Pro Thr Gly Cys Asp Lys Cys Val Trp Asp
 260 265 270
 Leu Thr Asp Asp Leu Arg Leu Ala Leu Ser Ile Glu Glu Gly Lys
 275 280 285
 Ser Gly Val Leu Ser Val Ser Ser Gly Ala Ala Ala His Arg His Val
 290 295 300
 Asn Glu Ile Asn Ala Thr Ile Tyr Leu Leu Lys Thr Lys Leu Ser Glu
 305 310 315 320
 Arg Glu Asn Gln Tyr Ala Leu Arg Lys Ile Gln Ile Asn Asn Ala Glu
 325 330 335
 Asn Thr Met Lys Ser Leu Leu Ser Asp Val Glu Glu Leu Val Glu Lys
 340 345 350
 Glu Asn Gln Ala Ser Arg Lys Gly Gln Leu Val Gln Lys Glu Ser Met
 355 360 365
 Asp Thr Ile Asn His Ala Ser Gln Leu Val Glu Gln Ala His Asp Met
 370 375 380
 Arg Asp Lys Ile Gln Glu Ile Asn Asn Lys Met Leu Tyr Tyr Gly Glu
 385 390 395 400
 Glu His Glu Leu Ser Pro Lys Glu Ile Ser Glu Lys Leu Val Leu Ala
 405 410 415
 Gln Lys Met Leu Glu Glu Ile Arg Ser Arg Gln Pro Phe Phe Thr Gln
 420 425 430
 Arg Glu Leu Val Asp Glu Glu Ala Asp Glu Ala Tyr Glu Leu Leu Ser
 435 440 445
 Gln Ala Glu Ser Trp Gln Arg Leu His Asn Glu Thr Arg Thr Leu Phe
 450 455 460
 Pro Val Val Leu Glu Gln Leu Asp Asp Tyr Asn Ala Lys Leu Ser Asp
 465 470 475 480
 Leu Gln Glu Ala Leu Asp Gln Ala Leu Asn Tyr Val Arg Asp Ala Glu
 485 490 495
 Asp Met Asn Arg Ala Thr Ala Ala Arg Gln Arg Asp His Glu Lys Gln
 500 505 510
 Gln Glu Arg Val Arg Glu Gln Met Glu Val Val Asn Met Ser Leu Ser
 515 520 525
 Thr Ser Ala Asp Ser Leu Thr Thr Pro Arg Leu Thr Leu Ser Glu Leu

ES 2 744 526 T3

530	Asp	Asp	Ile	Ile	Lys	Asn	Ala	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ala	Glu	Ile	Asp	Gly
545	Ala	Lys	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Lys	Leu	Ser	Asn	Leu	Ser	Asn	Leu	Ser
					565					570						575
	His	Asp	Leu	Val	Gln	Glu	Ala	Ile	Asp	His	Ala	Gln	Asp	Leu	Gln	Gln
					580					585						590
	Glu	Ala	Asn	Glu	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	His	Ser	Ser	Asp	Met	Asn	Gly
					595					600						605
	Leu	Val	Gln	Lys	Ala	Leu	Asp	Ala	Ser	Asn	Val	Tyr	Glu	Asn	Ile	Val
					610					615						620
	Asn	Tyr	Val	Ser	Glu	Ala	Asn	Glu	Thr	Ala	Glu	Phe	Ala	Leu	Asn	Thr
					625					630						635
	Thr	Asp	Arg	Ile	Tyr	Asp	Ala	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Thr	Gln	Ile	Ile
					645					650						655
	Tyr	His	Lys	Asp	Glu	Ser	Glu	Asn	Leu	Leu	Asn	Gln	Ala	Arg	Glu	Leu
					660					665						670
	Gln	Ala	Lys	Ala	Glu	Ser	Ser	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Ser
					675					680						685
	Arg	Arg	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Arg	Lys	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Arg
					690					695						700
	Leu	Ser	Asp	Ala	Val	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Asp	Ala
					705					710						715
	Gln	Gln	Arg	Leu	Gly	Gln	Ser	Arg	Leu	Ile	Thr	Glu	Glu	Ala	Asn	Arg
					725					730						735
	Thr	Thr	Met	Glu	Val	Gln	Gln	Ala	Thr	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Asn	Leu
					740					745						750
	Thr	Asn	Trp	Ser	Gln	Asn	Leu	Gln	His	Phe	Asp	Ser	Ser	Ala	Tyr	Asn
					755					760						765
	Thr	Ala	Val	Asn	Ser	Ala	Arg	Asp	Ala	Val	Arg	Asn	Leu	Thr	Glu	Val
					770					775						780
	Val	Pro	Gln	Leu	Leu	Asp	Gln	Leu	Arg	Thr	Val	Glu	Gln	Lys	Arg	Pro
					785					790						795
	Ala	Ser	Asn	Val	Ser	Ala	Ser	Ile	Gln	Arg	Ile	Arg	Glu	Leu	Ile	Ala
					805					810						815
	Gln	Thr	Arg	Ser	Val	Ala	Ser	Lys	Ile	Gln	Val	Ser	Met	Met	Phe	Asp
					820					825						830
	Gly	Gln	Ser	Ala	Val	Glu	Val	His	Ser	Arg	Thr	Ser	Met	Asp	Asp	Leu
					835					840						845
	Lys	Ala	Phe	Thr	Ser	Leu	Ser	Leu	Tyr	Met	Lys	Pro	Pro	Val	Lys	Arg
					850					855						860
	Pro	Glu	Leu	Thr	Glu	Thr	Ala	Asp	Gln	Phe	Ile	Leu	Tyr	Leu	Gly	Ser
					865					870						875
	Lys	Asn	Ala	Lys	Lys	Glu	Tyr	Met	Gly	Leu	Ala	Ile	Lys	Asn	Asp	Asn
					885					890						895
	Leu	Val	Tyr	Val	Tyr	Asn	Leu	Gly	Thr	Lys	Asp	Val	Glu	Ile	Pro	Leu
					900					905						910
	Asp	Ser	Lys	Pro	Val	Ser	Ser	Trp	Pro	Ala	Tyr	Phe	Ser	Ile	Val	Lys
					915					920						925
	Ile	Glu	Arg	Val	Gly	Lys	His	Gly	Lys	Val	Phe	Leu	Thr	Val	Pro	Ser
					930					935						940
	Leu	Ser	Ser	Thr	Ala	Glu	Glu	Lys	Phe	Ile	Lys	Lys	Gly	Glu	Phe	Ser
					945					950						955
	Gly	Asp	Asp	Ser	Leu	Leu	Asp	Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Thr	Val	Phe	Tyr
					965					970						975
	Val	Gly	Gly	Val	Pro	Ser	Asn	Phe	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu
					980					985						990
	Pro	Gly	Phe	Val	Gly	Cys	Leu	Glu	Leu	Ala	Thr	Leu	Asn	Asn	Asp	Val
					995					1000						1005
	Ile	Ser	Leu	Tyr	Asn	Phe	Lys	His	Ile	Tyr	Asn	Met	Asp	Pro	Ser	Thr
					1010					1015						1020
	Ser	Val	Pro	Cys	Ala	Arg	Asp	Lys	Leu	Ala	Phe	Thr	Gln	Ser	Arg	Ala
					1025					1030						1035
																1040

ES 2 744 526 T3

Ala Ser Tyr Phe Phe Asp Gly Ser Gly Tyr Ala Val Val Arg Asp Ile
1045 1050 1055
Thr Arg Arg Gly Lys Phe Gly Gln Val Thr Arg Phe Asp Ile Glu Val
1060 1065 1070
Arg Thr Pro Ala Asp Asn Gly Leu Ile Leu Leu Met Val Asn Gly Ser
1075 1080 1085
Met Phe Phe Arg Leu Glu Met Arg Asn Gly Tyr Leu His Val Phe Tyr
1090 1095 1100
Asp Phe Gly Phe Ser Gly Gly Pro Val His Leu Glu Asp Thr Leu Lys
1105 1110 1115 1120
Lys Ala Gln Ile Asn Asp Ala Lys Tyr His Glu Ile Ser Ile Ile Tyr
1125 1130 1135
His Asn Asp Lys Lys Met Ile Leu Val Val Asp Arg Arg His Val Lys
1140 1145 1150
Ser Met Asp Asn Glu Lys Met Lys Ile Pro Phe Thr Asp Ile Tyr Ile
1155 1160 1165
Gly Gly Ala Pro Pro Glu Ile Leu Gln Ser Arg Ala Leu Arg Ala His
1170 1175 1180
Leu Pro Leu Asp Ile Asn Phe Arg Gly Cys Met Lys Gly Phe Gln Phe
1185 1190 1195 1200
Gln Lys Lys Asp Phe Asn Leu Leu Glu Gln Thr Glu Thr Leu Gly Val
1205 1210 1215
Gly Tyr Gly Cys Pro Glu Asp Ser Leu Ile Ser Arg Arg Ala Tyr Phe
1220 1225 1230
Asn Gly Gln Ser Phe Ile Ala Ser Ile Gln Lys Ile Ser Phe Phe Asp
1235 1240 1245
Gly Phe Glu Gly Gly Phe Asn Phe Arg Thr Leu Gln Pro Asn Gly Leu
1250 1255 1260
Leu Phe Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Asp Val Phe Ser Ile Ser Leu Asp
1265 1270 1275 1280
Asn Gly Thr Val Ile Met Asp Val Lys Gly Ile Lys Val Gln Ser Val
1285 1290 1295
Asp Lys Gln Tyr Asn Asp Gly Leu Ser His Phe Val Ile Ser Ser Val
1300 1305 1310
Ser Pro Thr Arg Tyr Glu Leu Ile Val Asp Lys Ser Arg Val Gly Ser
1315 1320 1325
Lys Asn Pro Thr Lys Gly Lys Ile Glu Gln Thr Gln Ala Ser Glu Lys
1330 1335 1340
Lys Phe Tyr Phe Gly Gly Ser Pro Ile Ser Ala Gln Tyr Ala Asn Phe
1345 1350 1355 1360
Thr Gly Cys Ile Ser Asn Ala Tyr Phe Thr Arg Val Asp Arg Asp Val
1365 1370 1375
Glu Val Glu Asp Phe Gln Arg Tyr Thr Glu Lys Val His Thr Ser Leu
1380 1385 1390
Tyr Glu Cys Pro Ile Glu Ser Ser Pro Leu Phe Leu Leu His Lys Lys
1395 1400 1405
Gly Lys Asn Leu Ser Lys Pro Lys Ala Ser Gln Asn Lys Lys Gly Gly
1410 1415 1420
Lys Ser Lys Asp Ala Pro Ser Trp Asp Pro Val Ala Leu Lys Leu Pro
1425 1430 1435 1440
Glu Arg Asn Thr Pro Arg Asn Ser His Cys His Leu Ser Asn Ser Pro
1445 1450 1455
Arg Ala Ile Glu His Ala Tyr Gln Tyr Gly Gly Thr Ala Asn Ser Arg
1460 1465 1470
Gln Glu Phe Glu His Leu Lys Gly Asp Phe Gly Ala Lys Ser Gln Phe
1475 1480 1485
Ser Ile Arg Leu Arg Thr Arg Ser Ser His Gly Met Ile Phe Tyr Val
1490 1495 1500
Ser Asp Gln Glu Glu Asn Asp Phe Met Thr Leu Phe Leu Ala His Gly
1505 1510 1515 1520
Arg Leu Val Tyr Met Phe Asn Val Gly His Lys Lys Leu Lys Ile Arg
1525 1530 1535
Ser Gln Glu Lys Tyr Asn Asp Gly Leu Trp His Asp Val Ile Phe Ile

ES 2 744 526 T3

	1540		1545		1550										
Arg	Glu	Arg	Ser	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Ile	Asp	Gly	Leu	Arg	Val	Leu
	1555		1560		1565										
Glu	Glu	Ser	Leu	Pro	Pro	Thr	Glu	Ala	Thr	Trp	Lys	Ile	Lys	Gly	Pro
	1570		1575		1580										
Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Lys	Ala	Val	Lys	Asn	Val	Gln
1585			1590		1595				1595					1600	
Ile	Asn	Ser	Ile	Tyr	Ser	Phe	Ser	Gly	Cys	Leu	Ser	Asn	Leu	Gln	Leu
			1605						1610					1615	
Asn	Gly	Ala	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Ser	Gln	Thr	Phe	Ser	Val	Thr	Pro
			1620						1625					1630	
Cys	Phe	Glu	Gly	Pro	Met	Glu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Phe	Ser	Thr	Glu	Gly
	1635		1640						1645						
Gly	Tyr	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Ser	Phe	Asn	Ile	Gly	Leu	Lys	Phe	Glu
	1650		1655						1660						
Ile	Ala	Phe	Glu	Val	Arg	Pro	Arg	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Val	His
1665			1670						1675					1680	
Gly	His	Ser	Val	Asn	Gly	Glu	Tyr	Leu	Asn	Val	His	Met	Lys	Asn	Gly
			1685						1690					1695	
Gln	Val	Ile	Val	Lys	Val	Asn	Asn	Gly	Ile	Arg	Asp	Phe	Ser	Thr	Ser
			1700						1705					1710	
Val	Thr	Pro	Lys	Gln	Ser	Leu	Cys	Asp	Gly	Arg	Trp	His	Arg	Ile	Thr
	1715		1720						1725						
Val	Ile	Arg	Asp	Ser	Asn	Val	Val	Gln	Leu	Asp	Val	Asp	Ser	Glu	Val
	1730		1735						1740						
Asn	His	Val	Val	Gly	Pro	Leu	Asn	Pro	Lys	Pro	Ile	Asp	His	Arg	Glu
1745			1750						1755					1760	
Pro	Val	Phe	Val	Gly	Val	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Thr	Pro	Arg	Leu	
			1765						1770					1775	
Ala	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Thr	Gly	Cys	Ile	Arg	His	Phe	Val	Ile	Asp
			1780						1785					1790	
Gly	His	Pro	Val	Ser	Phe	Ser	Lys	Ala	Ala	Leu	Val	Ser	Gly	Ala	Val
	1795		1800						1805						
Ser	Ile	Asn	Ser	Cys	Pro	Ala	Ala								
	1810		1815												

<210> 29

<211> 334

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial quence

<220>

<223> Sintético

<400> 29

```

gacattgtgc tgacacagtc tctctgctcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gtactgggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaacct ctcactatc ttgcatcaa cctagaatct 180
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcaac acagtaggga gcttccattc 300
acgttcggct cggggacaaa gttggaata aaac 334

```

10 <210> 30

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintetizado

<400> 30

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

ES 2 744 526 T3

```

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

```

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 31

```

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met Tyr
1           5           10           15

```

10 <210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 32

```

Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1           5

```

<210> 33

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 33

```

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr
1           5

```

25 <210> 34

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Sintético

<400> 34

```

cagattcagt tggatgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
tcttgaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct aactggaga gccaacatat 180
gctgatgact tcaagggacg gtttgcttg tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240
ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac atggctacat atttctgtgc aagatatagg 300
tataataaat acgagagggc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca                                           363

```

<210> 35

35 <211> 121

<212> PRT

ES 2 744 526 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 35

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

5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Sintético

<400> 36

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5 10

<210> 37

15

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20

<400> 37

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 38

Tyr Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Arg Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

30

<210> 39

<211> 338

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Sintético

<400> 39

ES 2 744 526 T3

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
 atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagca cccgaaagaa cttcttgct 120
 tggtagcagc agaaaccagc gcagtctcct aaactgctga tctactggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gttattact gcaagcaatc ttataatcgg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacg 338

<210> 40
 <211> 112
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 40
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Ser Thr Arg Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Arg Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

10 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 15 <223> Sintético

<400> 41
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Thr Arg Lys Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Ala

<210> 42
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 42
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 25 1 5

<210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 43
 Lys Gln Ser Tyr Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 44
 35 <211> 351

ES 2 744 526 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

5 <400> 44
gagatccagc tgcagcagac tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaagg cttctgggta ttcattcact gactacatca tgctctgggt gaagcagagc 120
catggaaga gccttgagtg gattggaat attaatoctt actctggtag tagtggctac 180
aatctgaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcttccag cacagcctac 240
atgcagctca acagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagggaa 300
gactttgcta tggactactg gggccaagga acctcagtca ccgtctctc a 351

<210> 45
<211> 117

<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintetizado

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

15
Gly Asn Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Ser Ser Gly Tyr Asn Leu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Lys Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 46
<211> 10

<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 46
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Ile Met Leu
1 5 10

25 <210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
30 <223> Sintético

<400> 47
Asn Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Ser Ser Gly Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 48
<211> 7

<212> PRT
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 48
 Gly Lys Asp Phe Ala Met Asp
 1 5

5 <210> 49
 <211> 322
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Sintético

<400> 49
 gacattgtga tgactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct 60

ctttcatgca gggccagcca gagtattagc gactacttac actggtatca acaaaaatca 120
 catgagtctc caaggcttct catcaaatat gcttcccaat ccatctctgg gatcccctcc 180
 aggttcagtg gcagtgatc agggtcagat ttcactctca gtatcaacag tgtggaacct 240
 gaagatgttg gagtgtatta ctgtcaaat ggtcacaact ttctctggac gttcgggtga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa ac 322

15 <210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Sintetizado

<400> 50
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Asn Phe Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 51
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 51
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu His
 30 1 5 10

<210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Sintético

<400> 52

ES 2 744 526 T3

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5
 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 53
 Gln Asn Gly His Asn Phe Pro Arg Thr
 1 5
 10 <210> 54
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Sintético
 <400> 54
 caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgcagc ctggggctcc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cattttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacgag gcctcgagtg gattggaagg attgacctt ccgatagtaa aattcactac 180
 aatcaaaagt tcaaagacaa ggccacactg actgtagaca gatcctccag cacagcctac 240
 atccaactcg gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attattgtgc aaaagagggg 300
 ggtttacgac ggggggacta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360
 tcctca 366
 <210> 55
 <211> 122
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 55
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Pro Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Lys Ile His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Sintético
 <400> 56
 Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn
 1 5 10

ES 2 744 526 T3

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 57
 Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Lys Ile His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Asp

10 <210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 58
 Glu Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 59
 <211> 337
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 59
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaagtcact 60
 atgaactgca aatccagtcg gagtctgctc aacagtagaa tccgaaagaa ctactggct 120
 tgggtaccagc agaaccagc gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacagc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaac 337

25 <210> 60
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> Sintetizado

<400> 60
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Arg Ile Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

35 <210> 61
 <211> 17
 <212> PRT

ES 2 744 526 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 61
Lys Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser Arg Ile Arg Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

5 Ala

<210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 62
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

15 <210> 63
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

20 <400> 63
Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Leu Thr
 1 5

<210> 64
 <211> 360
 <212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 64
 gacgtgaagc tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatatca tgtcttgggt tcgtcagact 120
 ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtagtgc cacctactat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtac aagagatgat 300
 gattacgacg taaaggtatt tgcttactgg ggccaagga ctctggtcac tgtctctgca 360

30 <210> 65
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Sintetizado

<400> 65

ES 2 744 526 T3

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

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 66

Ser Tyr Ile Met Ser
 1 5

10 <210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 67

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 68

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 68

25 Asp Asp Asp Tyr Asp Val Lys Val Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 69

<211> 319

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Sintético

<400> 69

gatatccgga tgactcagtc tocttcactc ctgtctgcat ctgtggggga cagagtcact 60
 ctcaactgca aagcaagtca gaatatttat aacagcttag cctggtatca gcaaaagctt 120
 ggagaaggctc ccaaagtcct gatttttaat gcaaacagtt tgcaaacggg catcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc tggtagatc ttcacactca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatcttg ccacatattt ctgccagcag ttttatagcg ggtacacggt tggagctggg 300
 accaagctgg aactgaaac 319

ES 2 744 526 T3

<210> 70
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 70
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Gly Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asn Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile 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 Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

10 <210> 71
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 71
 Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Gly Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asn Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile 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 Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

20 <210> 72
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 72

ES 2 744 526 T3

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

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 73

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Ser Leu Ala
 1 5 10

10 <210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 74

Asn Ala Asn Ser Leu Gln Thr
 1 5

<210> 75

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 75

Gln Gln Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr
 1 5

25 <210> 76

<211> 354

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Sintético

<400> 76

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggt ctggtgcagc cctcacagac cctgtctctc 60
 acctgcactg tctctggatt ctcattaacc agcaatggtg taagctgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagt gattgcagca atatcatctg gtggaaccac atattataat 180
 tcagcgttca aatcccgact gagcatcagc aggaacacct ccaagagcca agttctctta 240
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgaagacaca gccatgtact tctgtgccag acggtatggg 300
 tacgggtggt actttgactt ctggggccca ggaacctggt tcacagtctc ctca 354

<210> 77

35 <211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 77

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

5

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Sintético

<400> 78

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn Gly Val Ser
 1 5 10

<210> 79

15

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20

<400> 79

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

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 80

Arg Tyr Gly Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

30

<210> 81

<211> 318

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Sintético

<400> 81

ES 2 744 526 T3

gacatccggg tgactcagtc tccttcactc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact 60
 ctcaactgca aaggaagtca gaatatttat aagagcttag cctggtttcg gctaaagcgt 120
 ggagaagctc ccaagctcct gatttatgat gcaaacagtt tgcaaacggg catcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat ttcacactca ccatcaccag cctacagcct 240
 gaagatggtg ccacatattt ctgccagcag tattatagcg gttacacggt tggagctggg 300
 accaagctgg aactgaaa 318

<210> 82
 <211> 106
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 82
 Asp Ile Arg Val Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Gly Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Arg Leu Lys Arg Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

10 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 83
 <211> 318
 <212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 83
 gacatccagg tgactcagtc tccttcactc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact 60
 ctcaactgca aaggaagtca gaatatttat aagagcttag cctggtttcg gctaaagcgt 120
 ggagaagctc ccaagctcct gatttatgat gcaaacagtt tgcaaacggg catcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat ttcacactca ccatcaccag cctacagcct 240
 gaagatggtg ccacatattt ctgccagcag tattatagcg gttacacggt tggagctggg 300
 accaagctgg aactgaaa 318

20 <210> 84
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

25 <223> Sintetizado

<400> 84

ES 2 744 526 T3

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

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 85

Lys Gly Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Ser Leu Ala
 1 5 10

10 <210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 86

Asp Ala Asn Ser Leu Gln Thr
 1 5

<210> 87

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 87

Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr
 1 5

25 <210> 88

<211> 348

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Sintético

<400> 88

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggt ctggtgcagt cctcacagac cctgtctctc 60
 acctgcactg tctctggatt ctcattaacc agtaatggtg taagctgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagt gattgcagca atatcaagtg gtggaagcac atattataat 180
 tcagcgttca aatcccgact gagcatcagc aggaacacct ccaagagcca agttctctta 240
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgaagacaca ggcatgtact tctgtgccag acatagaccg 300
 ttctactttg attactgggg ccaaggagtc atggtcacag tctcctca 348

<210> 89

35 <211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 89

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

<210> 90

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 90

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn Gly Val Ser
 1 5 10

<210> 91

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Sintético

<400> 91

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

<210> 92

25 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

30 <400> 92

His Arg Pro Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 93

<211> 120

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 93

ES 2 744 526 T3

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

5 <210> 94
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 94
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Asp Asp Asp Tyr Asp Val Lys Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 95
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 95
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Asp Asp Asp Tyr Asp Val Lys Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20 <210> 96

ES 2 744 526 T3

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 96
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Ala Ile Phe Gly Val Val Ser His Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 97
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 97
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Arg Ile Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

15 <210> 98
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 98
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser

ES 2 744 526 T3

```

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

```

<210> 99

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 99

```

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

```

10 <210> 100

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 100

```

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

```

<210> 101

<211> 116

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 101

ES 2 744 526 T3

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

<210> 102

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 102

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

10 <210> 103

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 103

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

<210> 104

<211> 116

<212> PRT

ES 2 744 526 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 104

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

5

<210> 105

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Sintético

<400> 105

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

15

<210> 106

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Sintético

<400> 106

ES 2 744 526 T3

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

<210> 107

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 107

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

10 <210> 108

<211> 131

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 108

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

<210> 109
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 109
 Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Gly Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Arg Leu Lys Arg Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

10 <210> 110
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 110
 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 Lys Gly Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

20 <210> 111
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 111
 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 Lys Gly Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Leu Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

ES 2 744 526 T3

<210> 112
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 112
 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 Asn Cys Lys Gly Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 113
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Sintético

<400> 113
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Pro
 85 90 95
 Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

20

<210> 114
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 114

ES 2 744 526 T3

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

<210> 115

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 115

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

10 <210> 116

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 116

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

<210> 117

<211> 118

ES 2 744 526 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

5 <400> 117
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Ser
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Phe Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Arg Tyr Gly Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 118
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

15 <400> 118
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Gln
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Phe Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Arg Tyr Gly Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

20 <210> 119
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 119

ES 2 744 526 T3

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

115

5 <210> 120
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 120
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Gly Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Pro Asn Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile 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 Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 121
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 121
 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 Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asn Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile 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 Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

20 <210> 122
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 744 526 T3

<220>
<223> Sintético

<400> 122

5 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 Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asn Ala Asn Ser Leu Gln Thr 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 Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 123
<211> 106
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 123

15 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 Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asn Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile 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 Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 124
<211> 107
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 124

25 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 Arg
 85 90 95
 Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 125
<211> 14
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 125

5 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 126

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Sintético

<400> 126

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg
20 25 30

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 127

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 128

<211> 14

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 128

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

30 <210> 129

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Sintético

<400> 129

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 130

<211> 32

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 130

ES 2 744 526 T3

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

 <210> 131
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <400> 131
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

 10 <210> 132
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 15 <223> Sintético

 <400> 132
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 <210> 133
 <211> 25
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <400> 133
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25
 25

 <210> 134
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintético

 <400> 134
 Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Ile Ala
 1 5 10

 35 <210> 135
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 40 <400> 135
 Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

ES 2 744 526 T3

<210> 136
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 136
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

10 <210> 137
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 137
 Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 138
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 138
 Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asn Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

25 <210> 139
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 139
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser Ser Gly Val Ser
 1 5 10

35 <210> 140
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 140
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser Gln Gly Val Ser
 1 5 10

40 <210> 141
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Sintético

<400> 141
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn Ala Val Ser
 1 5 10

5 <210> 142
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 142
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
 20

<210> 143
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 143
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

20 <210> 144
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Sintético

<400> 144
Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 145
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 145
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 35 1 5 10

<210> 146
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sintético

<400> 146
Trp Phe Gln Leu Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

ES 2 744 526 T3

<210> 147
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 147
 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 Asn Cys
 20

10 <210> 148
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 148
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Phe
 1 5 10 15

<210> 149
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 149
 Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

25 <210> 150
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 150
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

35 <210> 151
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 151
 Ser Asn Gly Val Ser
 1 5

40 <210> 152
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>

ES 2 744 526 T3

<223> Sintético

<400> 152
Ser Ser Gly Val Ser
 1 5

5 <210> 153
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 153
Arg Tyr Gly Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

<210> 154
 <211> 32
 <212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 154
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

20 <210> 155
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 155
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 156
 <211> 120
 <212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 156
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

35

ES 2 744 526 T3

```

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

```

<210> 157

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 157

```

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

```

10 <210> 158

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintetizado

<400> 158

```

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

```

20 <210> 159

<211> 120

ES 2 744 526 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

5 <400> 159
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Leu Gly Glu Leu Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 160
 <211> 113
 <212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 160
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Arg Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Arg Ile Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

15 <210> 161
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Sintetizado

<400> 161

ES 2 744 526 T3

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

<210> 162

<211> 114

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 162

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

10 <210> 163

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintetizado

<400> 163

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

20 <210> 164

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 744 526 T3

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 164
 atggagttcg gcctgtcctg gctgttctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtc 57

5 <210> 165
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 165
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys

<210> 166
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 166
 atggactgga cctggagcat ccttttctg gtggcagcag caacaggtgc cactcc 57

<210> 167
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 167
 Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

30 Ala His Ser

<210> 168
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 168
 atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
 tccggc 66

<210> 169
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

45 <400> 169
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Ser Gly Ser Ser Gly
 20

ES 2 744 526 T3

<210> 170
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 170
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

10 <210> 171
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

15 <400> 171
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

20 <210> 172
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 172

ES 2 744 526 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 173

5 <211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

10 <400> 173

ES 2 744 526 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 174

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 174

ES 2 744 526 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 175

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 175

ES 2 744 526 T3

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

<210> 176
 <211> 450
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 176
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Asp Asp Asp Tyr Asp Val Lys Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

10

ES 2 744 526 T3

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 177

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 177

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

10

ES 2 744 526 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 178

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 178

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

10

<210> 179

ES 2 744 526 T3

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Péptido sintético

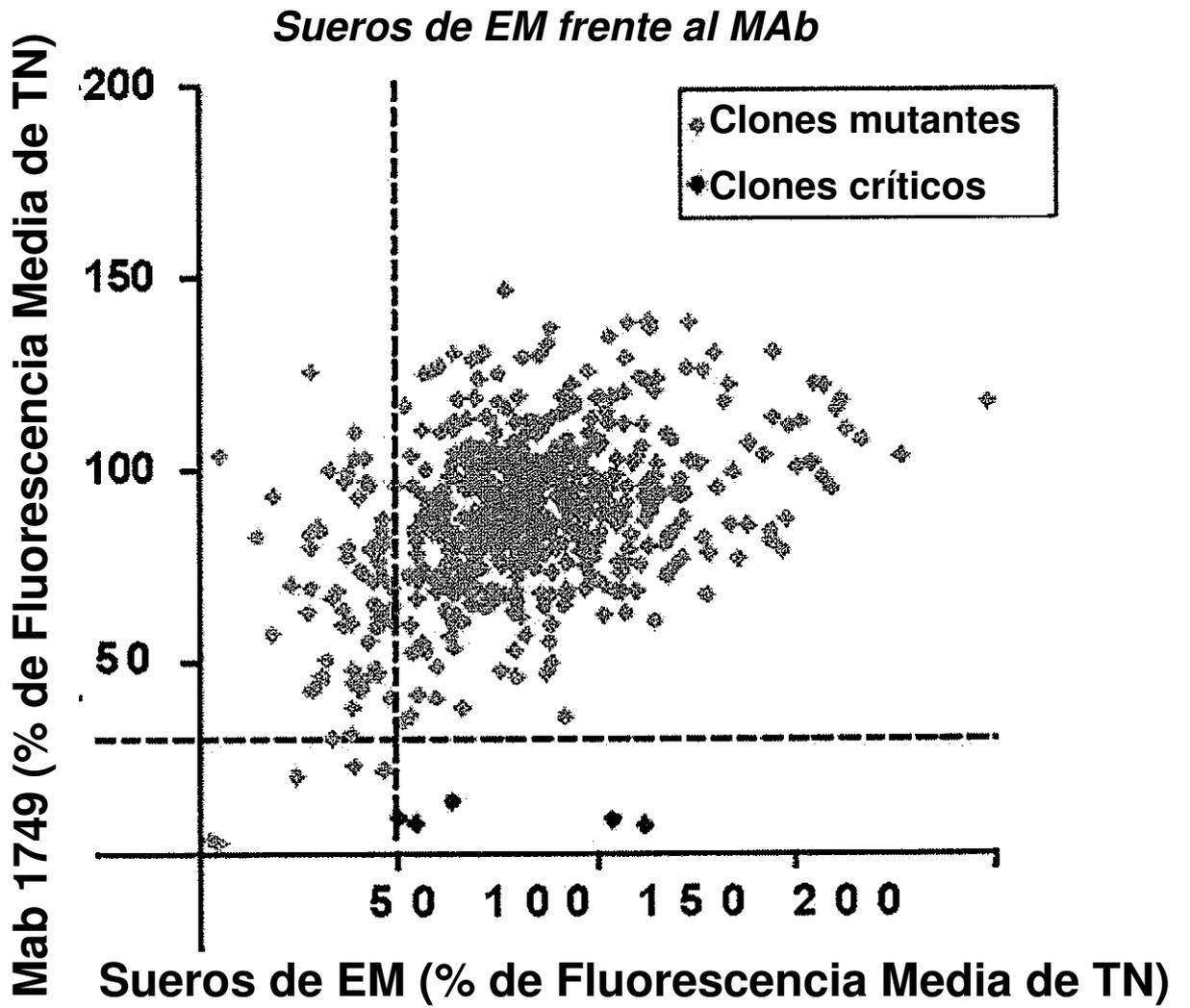
<400> 179

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que inhibe la unión de MCAM a laminina- α 4 que comprende:
 - (a) una región variable madura de la cadena pesada que comprende tres CDRs de Kabat de SEQ ID N^os: 66-68 respectivamente, y que es al menos un 97% idéntica a la SEQ ID N^o: 156; y
 - 5 (b) una región variable madura de la cadena ligera que comprende tres CDRs de Kabat de SEQ ID N^os: 61-63 respectivamente, y que es al menos un 97% idéntica a la SEQ ID N^o: 160.
2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que la región variable madura de la cadena pesada es al menos un 98% idéntica a la SEQ ID N^o: 156 y la región variable madura de la cadena ligera es al menos un 97% idéntica a la SEQ ID N^o: 160, o en la que la región variable madura de la cadena pesada es al menos un 99% idéntica a la SEQ ID N^o: 156 y la región variable madura de la cadena ligera es al menos un 97% idéntica a la SEQ ID N^o: 160, o en la que la región variable madura de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N^o: 156 y la región variable madura de la cadena ligera es un 97% idéntica a la SEQ ID N^o: 160, o en la que la región variable madura de la cadena pesada es al menos un 97% idéntica a la SEQ ID N^o: 156 y la región variable madura de la cadena ligera es al menos un 98% idéntica a SEQ ID N^o: 160, o en la que la región variable madura de la cadena pesada es al menos un 97% idéntica a la SEQ ID N^o: 156 y la región variable madura de la cadena ligera es al menos un 99% idéntica a la SEQ ID N^o: 160, o en la que la región variable madura de la cadena pesada es al menos un 97% idéntica a la SEQ ID N^o: 156 y la región variable madura de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N^o: 160, o en la que la región variable madura de la cadena pesada es al menos un 98% idéntica a la SEQ ID N^o: 156 y la región variable madura de la cadena ligera es al menos un 98% idéntica a SEQ ID N^o: 160, o en la que la región variable madura de la cadena pesada es al menos un 99% idéntica a la SEQ ID N^o: 156 y la región variable madura de la cadena ligera es al menos un 99% idéntica a la SEQ ID N^o: 160.
3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que la región variable madura de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N^o: 156 y la región variable madura de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N^o: 160.
- 25 4. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, con tal de que además la posición 3 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada esté ocupada por K y/o la posición 93 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada esté ocupada por T y/o la posición 42 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada esté ocupada por E y/o la posición 43 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena ligera esté ocupada por S y/o la posición 9 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada ligera esté ocupada por S y/o la posición 19 (numeración de Kabat) de la región variable madura de la cadena pesada ligera esté ocupada por V.
- 30 5. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un fragmento de unión al antígeno.
6. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un anticuerpo intacto.
- 35 7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Un anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para el uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio en un sujeto mamífero, **caracterizado por la** infiltración de células que expresan MCAM en un sitio de inflamación en el cuerpo.
- 40 9. Un anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para el uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto mamífero, **caracterizado por la** infiltración de células que expresan MCAM en el SNC.
- 45 10. Un anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para el uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, psoriasis, un tumor sólido, tal como melanoma, sarcoidosis, artritis psoriásica, enfermedad de Parkinson, dermatitis de contacto alérgica, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, o enfermedad de Crohn en un sujeto mamífero.

FIG. 1



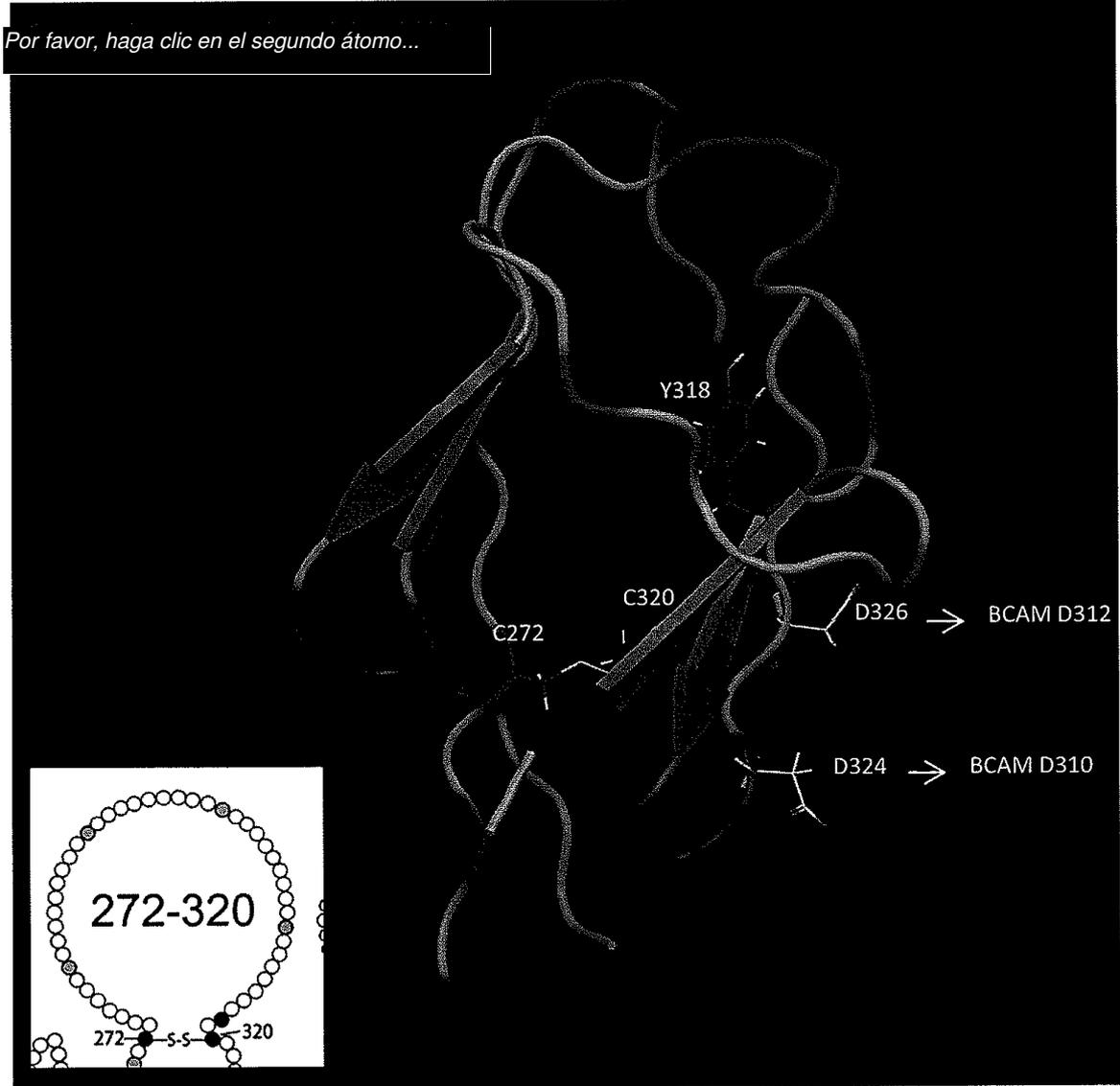


FIG. 2

Figura 3A

Mayoría	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTINCKSSXSLNLSRKRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR	
	10 20 30 40 50 60	
1749VL proteína	DIVMSQSPSSLAVSAGEKRVTMNCKSSRSLNLSRIRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR	60
2LTQVL	DIVMSQSPSSLAVSAGEKRVTMNCKSSRSLNLSRIRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR	60
ABA71407.1	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTINCKSSQSAIYRSNNKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR	60
CAI99800.1	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTINCKSSLTIVLSTANRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR	60
hu1749VLv3 proteína	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTINCKSSRSLNLSRIRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR	60
Mayoría	ESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYNL-LTFGGGTKLEIKR	
	70 80 90 100 110	
1749VL proteína	ESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYNL-LTFGGGTKLEIKR	113
2LTQVL	ESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYNL-LTFGGGTKLEIKR	113
ABA71407.1	ESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYRIP-LTFGGGTKLEIKR	114
CAI99800.1	ESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYST-LTFGGGTKLEIKR	112
hu1749VLv3 proteína	ESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYNL-LTFGGGTKLEIKR	113

Figura 3B

Mayoría	EVQLVESGGGLVQPKGGSLKLSCAASGFTFSYXMSWVRQTPPKRLEWVATISSGGSSTYY	
	10 20 30 40 50 60	
1749VH proteína	EVQLVESGGGLVQPKGGSLKLSCAASGFTFSYIMSWVRQTPPKRLEWVATISSGGSSTYY	60
1HI LVH	EVQLVESGGGLVQPKGGSLKLSCAASGFTFSYIMSWVRQTPPKRLEWVATISSGGSSTYY	60
AAx82494.1	EVQLVESGGGLVQPKGGSLKLSCAASGFTFSYIMSWVRQTPPKRLEWVATISSGGSSTYY	60
ADx65676.1	EVQLVESGGGLVQPKGGSLKLSCAASGFTFSYIMSWVRQTPPKRLEWVATISSGGSSTYY	60
hu1749VHv3 proteína	EVQLVESGGGLVQPKGGSLKLSCAASGFTFSYIMSWVRQTPPKRLEWVATISSGGSSTYY	60
Mayoría	PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARDDDYDVKVFAYWGQGLVTVSS	
	70 80 90 100 110 120	
1749VH proteína	PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARDDDYDVKVFAYWGQGLVTVSS	120
1HI LVH	PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARRERYDENGFAIWGQGLVTVSS	120
AAx82494.1	PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARLYYGYRYFFAIYWGQGLVTVSS	120
ADx65676.1	PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARDDYDGLSHFAIWGQGLVTVSS	120
hu1749VHv3 proteína	PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARDDDYDVKVFAYWGQGLVTVSS	120

Decoración 'Decoración n° 1': Residuos de caja que difieren del consenso.