

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 162**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 1/04** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2017 PCT/JP2017/000605**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17122666**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2017 E 17738420 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2022 EP 3404040**

54 Título: **Anticuerpo anti-Myl9**

30 Prioridad:

**12.01.2016 JP 2016003429**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.05.2022**

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA  
UNIVERSITY (50.0%)  
1-33, Yayoi-cho Inage-ku  
Chiba-shi, Chiba 263-8522, JP y  
EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NAKAYAMA, TOSHINORI;  
KIMURA, MOTOKO;  
HAYASHIZAKI, KOJI;  
HIRAYAMA, TOSHIFUMI;  
KAKUTA, JUNGO;  
SAKAMOTO, YOSHIMASA;  
GEJIMA, RYU;  
TOKITA, DAISUKE;  
MURAMOTO, KENZO y  
IMAI, TOSHIO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 913 162 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpo anti-Myl9

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une al polipéptido de cadena ligera reguladora de miosina (Myl)9 o a un fragmento de unión a Myl9 del mismo, así como a una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a Myl9 del mismo.

10 **Antecedentes de la técnica**

CD69 es una proteína transmembrana tipo II que pertenece a la familia de las lectinas tipo C. CD69 se emplea ampliamente como un indicador de la activación de los linfocitos (Bibliografía 1 no de patente), y hasta ahora se ha dado a conocer que está implicada en enfermedades inflamatorias tales como inflamación local, artritis, y síntomas alérgicos de las vías respiratorias (Bibliografía 2 y 3 no de patente).

En los últimos años, se ha dado a conocer que CD69 interactúa con el polipéptido de cadena ligera reguladora de miosina (Myl)9, que es una de las subunidades que configuran la miosina, y con esto, se han puesto a la vista estrategias terapéuticas de enfermedades inflamatorias que se dirigen contra Myl9 (Bibliografía 1 de patente). Huang et al. (Med. Oncol, 2014, 31:820) describen que la menor expresión de MYL9 puede desempeñar un papel importante en la progresión tumoral del cáncer de próstata.

Un inhibidor del punto de control inmunitario es un grupo de fármacos contra el cáncer desarrollados recientemente, e inhibe las proteínas expresadas en las células cancerosas y linfocitos (células T) que frenan el sistema inmunitario. Las proteínas se denominan puntos de control inmunitarios. Se sabe que la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), y el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), y similares, actúan como puntos de control inmunitarios. Se han aprobado varios inhibidores del punto de control inmunitario como fármacos, y sus usos terapéuticos incluyen melanoma maligno, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales, linfoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer urotelial. Además, el tratamiento de los inhibidores del punto de control inmunitario, solos o en combinación con otro fármaco contra el cáncer, es eficaz contra cánceres tales como el cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón microcítico, mesotelioma, cáncer de endometrio, según los resultados de los ensayos clínicos.

35 **Lista de citas**

**Bibliografía de patente**

40 [Bibliografía 1 de patente] WO2014/192915

**Bibliografía no de patente**

45 [Bibliografía 1 no de patente] Testi, R. et al., Immunol. Today 15:479-483, 1994.

[Bibliografía 2 no de patente] Murata, K. et al.: CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. Int. Immunol. 15:987-992, 2003

50 [Bibliografía 3 no de patente] Miki-Hosokawa, T. et al.: CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. J. Immunol. 183; 8203-8215, 2009

**Sumario de la invención**

55 **Problema técnico**

Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno pueden convertirse en fármacos terapéuticos deseables debido a la especificidad de unión que poseen. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden emplearse para minimizar los efectos secundarios potenciales al dirigirse únicamente a células o tejidos particulares. Existe la necesidad de identificar un anticuerpo útil para dirigirse contra Myl9, así como un anticuerpo humanizado que se use como producto farmacéutico.

Por consiguiente, el objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-Myl9 o un fragmento de unión a Myl9 del mismo que se una a Myl9 y pueda inhibir la interacción entre Myl9 y CD69 en seres humanos, así como una composición farmacéutica que comprenda el mismo.

**Solución al problema**

Como resultado de una extensa investigación para resolver los problemas anteriores, los presentes inventores lograron obtener un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Myl9 de ratón/humana que se une a Myl9 humana y de ratón y puede inhibir la interacción con CD69. En consecuencia, los presentes inventores obtuvieron un anticuerpo humanizado o quimérico que comprende la secuencia de la región determinante de la complementariedad (CDR, (a veces puede denominarse "región hipervariable")) de dicho anticuerpo monoclonal de ratón anti-Myl9 de ratón/humana en la región variable de las cadenas pesadas y ligeras mediante la identificación de la CDR de dicho anticuerpo monoclonal de ratón anti-Myl9 de ratón/humana.

En otras palabras, la presente invención abarca las siguientes características.

<insertar páginas 2a-2c

1. [1] Un anticuerpo anti-polipéptido de cadena ligera reguladora de la miosina (Myl)9 o un fragmento de unión a Myl9 del mismo, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los siguientes anticuerpos:

- (1) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 64, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- (2) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 63, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- (3) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 56, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- (4) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 57, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- (5) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 55, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- (6) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 58, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- (7) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 59, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- (8) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 60, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- (9) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 61, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- (10) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 64, y una región variable

de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68;

- 5 (11) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 63, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68;
- 10 (12) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 56, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68;
- 15 (13) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 57, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68;
- 20 (14) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 55, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68;
- 25 (15) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 58, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68;
- 30 (16) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 59, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68;
- 35 (17) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 60, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68;
- 40 (18) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 61, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68;
- 45 (19) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 62, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 65;
- 50 20. (20) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 62, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 67;
- 55 (21) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 62, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66; y
- 60 (22) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 62, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68.
- 65 2. [2] El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo según [1], que comprende cadenas pesadas y ligeras, en el que la región constante de dicha cadena pesada es IgG.



3. [3] El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo según [2], en el que la región constante de dicha cadena pesada es la región constante de IgG2 humana.
4. [4] El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo según [3], en el que dicha región constante de IgG2 humana posee mutaciones V234A y G237A.
5. [5] El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo según [3] o [4], en el que dicha región constante tiene la supresión del resto de lisina C-terminal.
6. [6] El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo según [2], en el que la región constante de dicha cadena ligera comprende la región constante de Igk humana.
7. [7] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a Myl9 del mismo según uno cualquiera de [1]-[6], y un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable.
8. [8] La composición farmacéutica según [7], para uso en el tratamiento de inflamación alérgica de las vías respiratorias o enfermedad inflamatoria del intestino.
9. [9] La composición farmacéutica según [8], en la que la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
10. [10] La composición farmacéutica según [7], para uso en el tratamiento de cáncer colorrectal, en el que la composición farmacéutica se usa en combinación con un anticuerpo anti-PD-1.

Una invención de cualquier combinación de uno o múltiples aspectos de la presente invención como se reivindica también está incluida en el alcance de la presente invención.

#### Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti-Myl9 o un fragmento de unión a Myl9 del mismo que se une a Myl9 como se reivindica y puede inhibir la interacción entre Myl9 y CD69, así como una composición farmacéutica que comprende el mismo.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1-1 muestra cada una de la comparación de secuencias de aminoácidos entre Myl9 de ratón y Myl9 humana (A), y la comparación de secuencias de aminoácidos entre Myl3 de ratón y Myl3 humana (B). \*\*:aminoácido conservado; -: espacio; subrayado: secuencia de aminoácidos de un péptido usado para la inmunización de ratones para preparar el Anticuerpo A.

La Figura 1-2 muestra cada una de la comparación de secuencias de aminoácidos entre Myl3 de ratón y Myl9 de ratón (C), y la comparación de secuencias de aminoácidos entre Myl3 humana y Myl9 humana (D). \*\*:aminoácido conservado; -: espacio.

La Figura 2 es el resultado que muestra la capacidad de unión del anticuerpo monoclonal anti-Myl9 de ratón/humana (Anticuerpo A) a Myl9 de ratón y Myl9 humana, así como a Myl3 de ratón y Myl3 humana.

La Figura 3 muestra la unión dependiente de la concentración de CD69 de ratón (A) con o (B) sin una cadena de azúcar a Myl9 de ratón, así como que dicha unión fue significativamente inhibida por el anticuerpo monoclonal anti-Myl9 de ratón/humana (Anticuerpo A) (C).

La Figura 4-1 muestra el efecto de supresión de la administración del anticuerpo monoclonal anti-Myl9 de ratón/humana (Anticuerpo A) sobre la infiltración celular alrededor del tubo bronquial que se induce en el momento de la inflamación de las vías respiratorias. La Figura 4A muestra los resultados de la tinción con hematoxilina/eosina (tinción HE) y la tinción con PAS después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-Myl9 de ratón/humana (Anticuerpo A) a ratones con inflamación inducida de las vías respiratorias. La Figura 4B muestra el número de células infiltrantes observadas en el líquido de lavado broncoalveolar y los tipos de células infiltrantes después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-Myl9 de ratón/humana (Anticuerpo A) a ratones con inflamación inducida de las vías respiratorias. La Figura 4C muestra la cantidad de citocina producida después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-Myl9 de ratón/humana (Anticuerpo A) a ratones con inflamación inducida de las vías respiratorias.

La Figura 4-2 muestra la comparación de la resistencia de las vías respiratorias inducida por metacolina en el Día 17 después de la inducción de la inflamación de las vías respiratorias entre el grupo de administración del Anticuerpo A (D), el grupo de administración del anticuerpo policlonal anti-Myl9/12 (E), y los grupos de administración del anticuerpo de control (D, E).

La Figura 5 muestra los resultados de la pérdida de peso (figura superior) y el índice de actividad de la enfermedad (DAI) (figura inferior) debido al anticuerpo monoclonal anti-Myl9 de ratón/humana (Anticuerpo A) en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de transferencia de linfocitos T CD4 positivos CD45RB-fuertemente positivos (CD4 + CD45RB<sup>high</sup>).

La Figura 6-1 muestra los resultados de ELISA que evalúan la capacidad de unión de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A contra Myl9 humana.

La Figura 6-2 muestra los resultados de ELISA que evalúan la capacidad de unión de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A contra Myl9 humana.

La Figura 6-3 muestra los resultados de ELISA que evalúan la capacidad de unión de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A contra Myl9 humana.

La Figura 7 muestra cada una de la comparación de secuencias de aminoácidos entre Myl9 de ratón, Myl12a de ratón y Myl12b de ratón (A), y la comparación de secuencias de aminoácidos entre Myl9 humana, Myl12a humana, y Myl12b humana (B). \*:aminoácido conservado; -: espacio; subrayado: secuencia de aminoácidos de un péptido usado para la inmunización de ratones para preparar el Anticuerpo A.

La Figura 8 muestra los resultados de ELISA que evalúan la capacidad de unión del Anticuerpo A a Myl9 de ratón, Myl12a de ratón y Myl12b de ratón (A), así como a Myl9 humana, Myl12a humana, y Myl12b humana (B).

La Figura 9A muestra los resultados de ELISA que evalúan la capacidad de unión de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A contra Myl12a y 12b humanas.

La Figura 9B muestra los resultados de ELISA que evalúan la capacidad de unión del anticuerpo humanizado preparado a partir del Anticuerpo A contra Myl12a y 12b humanas.

La Figura 9C muestra los resultados de ELISA que evalúan la capacidad de unión del anticuerpo humanizado preparado a partir del Anticuerpo A contra Myl12a y 12b humanas.

La Figura 10 muestra la comparación de secuencias de aminoácidos de regiones extracelulares de CD 69 humana y de ratón.

La Figura 11 muestra la unión dependiente de la concentración de la región extracelular de CD69 humana a Myl9 humana, así como a Myl12a y 12b, que tienen una alta homología con Myl9 humana.

La Figura 12 muestra los resultados de la inhibición dependiente de la concentración del Anticuerpo A de la unión entre las regiones extracelulares de CD69 humana y Myl9 humana (A), Myl12a humana (B) o Myl12b humana (C).

La Figura 13-1 muestra los resultados de la inhibición dependiente de la concentración de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A de la unión entre Myl9 humana y la región extracelular de CD69 humana.

La Figura 13-2 es la continuación de la Figura 13-1.

La Figura 13-3 es la continuación de la Figura 13-2.

La Figura 13-4 es la continuación de la Figura 13-3.

La Figura 13-5 es la continuación de la Figura 13-4.

La Figura 14-1 muestra los resultados de la inhibición dependiente de la concentración de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A de la unión entre Myl12a humana o Myl12b humana y la región extracelular de CD69 humana.

La Figura 14-2 es la continuación de la Figura 14-1.

La Figura 14-3 es la continuación de la Figura 14-2.

La Figura 14-4 es la continuación de la Figura 14-3.

La Figura 15 muestra los resultados del análisis de expresión de Myl9, Myl12a y Myl12b en tejido tumoral subcutáneo en la línea celular de cáncer colorrectal de ratón CT26.WT

La Figura 16 muestra la inhibición del crecimiento tumoral en el grupo de control (A), el grupo de administración del Anticuerpo A solo (B), el grupo de administración del anticuerpo anti PD-1 solo (C), y el grupo de administración de la combinación del Anticuerpo A y el anticuerpo anti PD-1 (D), en modelos de trasplante subcutáneo de la línea celular de cáncer colorrectal de ratón CT26.WT.

### Descripción de las realizaciones

según se reivindican

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-Myl9 como se reivindica, que se une al polipéptido de cadena ligera reguladora de la miosina (descrito en lo sucesivo como Myl) 9.

El anticuerpo anti-Myl9 usado en la presente invención es un anticuerpo que puede reconocer y unirse a Myl9, y como se describe más abajo, dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto. Como alternativa, el anticuerpo anti-Myl9 usado en la presente invención puede ser un anticuerpo recombinante (tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano), o un anticuerpo sintetizado químicamente, así como un fragmento de unión a antígeno del mismo, siempre que posea la afinidad de unión a Myl9 y secuencia como se reivindica. Puede entenderse que Myl9 aquí se refiere a Myl9 derivado de ser humana o de ratón. La secuencia de aminoácidos de Myl9 derivada de ser humana o de ratón se puede obtener de bases de datos públicas en las que se registra la información de la secuencia de genes y de aminoácidos, tal como Genbank proporcionada por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América; o la secuencia de aminoácidos se puede determinar a partir de la información de la secuencia del gen Myl9 que se obtiene diseñando un cebador basado en la información de la secuencia de bases de Myl9 de una especie animal estrechamente relacionada y clonando a partir del ARN extraído de la especie animal deseada. Por ejemplo, la información de la secuencia de aminoácidos de Myl9 humana y de ratón está registrada en la base de datos con el número de acceso de Genbank NP\_006088.2 (SEQ ID NO. 2), y el número de acceso de Genbank NP\_742116.1 (SEQ ID NO. 1), respectivamente.

En un aspecto de la presente invención, Myl9 comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 1, o un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene una o múltiples sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en dicha secuencia de aminoácidos. "Múltiple", como se usa aquí en referencia a Myl9, no está limitado siempre que se conserven las propiedades funcionales equivalentes a las de un péptido representado por la secuencia de aminoácidos original del mismo, y es 2 a 20, por ejemplo 2 a 15, 2 a 10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, o 2 a 5. En otro aspecto de la presente invención, Myl9 comprende un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, por ejemplo 91%, 92%, 93%, 94%, o 95% de homología con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 1.

Como se usa aquí, la "homología" de la secuencia de aminoácidos significa una homología calculada por Alineación por Pares usando el algoritmo CLUSTALW bajo la siguiente configuración de parámetros:

Tamaño de K-tuplo (palabra): 1

Tamaño de la ventana: 5

Penalización de espacio: 3

Número de diagonales superiores: 5

Método de puntuación: PORCENTAJE

En un aspecto de la presente invención, Myl9 comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2, o un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene una o múltiples sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en dicha secuencia de aminoácidos. "Múltiple", como se usa aquí en referencia a Myl9, no está limitado siempre que se conserven las propiedades funcionales equivalentes a las de un péptido representado por la secuencia de aminoácidos original del mismo, y es 2 a 20, por ejemplo 2 a 15, 2 a 10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, o 2 a 5. En otro aspecto de la presente invención, Myl9 comprende un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, por ejemplo 91%, 92%, 93%, 94%, o 95% de homología con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2.

En un aspecto de la presente invención, Myl9 comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 3, o un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene una o múltiples sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en dicha secuencia de aminoácidos. "Múltiple", como se usa aquí en referencia a Myl9, no está limitado siempre que se conserven las propiedades funcionales equivalentes a las de un péptido representado por la secuencia de aminoácidos original del mismo, y es 2 a 20, por ejemplo 2 a 15, 2 a

10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, o 2 a 5. En otro aspecto de la presente invención, Myl9 comprende un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, por ejemplo 91%, 92%, 93%, 94%, o 95% de homología con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 3.

5 En un aspecto de la presente invención, las secuencias de aminoácidos de Myl9 de ratón y Myl12a de ratón, y de Myl9 de ratón y Myl12b de ratón tienen una homología del 94,2% y 93,6%, respectivamente, y de Myl12a de ratón y Myl12b de ratón tienen una homología del 97,7%. Las secuencias de aminoácidos de Myl9 humana y Myl12a humana, y de Myl9 humana y Myl12b humana tienen una homología del 91,8% y 93,0%, respectivamente, y de Myl12a humana y Myl12b humana tienen una homología del 96,5%. Por esta razón, un anticuerpo que reconoce Myl9 a veces reconoce Myl12a. Además, un anticuerpo que reconoce Myl9 a veces reconoce Myl12b. De este modo, en una realización de la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención también puede reconocer Myl12a y/o Myl12b.

15 En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención es un anticuerpo según se reivindica que inhibe la unión entre Myl9 y la región extracelular de CD69. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se reivindica que inhibe la unión entre cualquier parte de la región extracelular de CD69 y Myl9, que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 4, o un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene una o múltiples sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en dicha secuencia de aminoácidos. "Múltiple", como se usa aquí en referencia a la región extracelular de CD69, es, pero no se limita a, 2 a 15, por ejemplo 2 a 14, 2 a 13, 2 a 12, 2 a 11, 2 a 10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, o 2 a 5. En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se reivindica que inhibe la unión entre cualquier parte de la región extracelular de CD69, que comprende un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, por ejemplo 91%, 92%, 93%, 94%, o 95% de homología con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 4 y Myl9.

30 En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención es un anticuerpo según se reivindica que inhibe la unión entre Myl12a y/o Myl12b y la región extracelular de CD69. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se reivindica que inhibe la unión entre cualquier parte de la región extracelular de CD69, que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 97, o un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene una o múltiples sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en dicha secuencia de aminoácidos y Myl12a y/o Myl12b. En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se reivindica que inhibe la unión entre cualquier parte de la región extracelular de CD69, que comprende un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, por ejemplo 91%, 92%, 93%, 94%, o 95% de homología con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 97 y Myl12a y/o Myl12b.

40 En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo como se reivindica puede unirse a Myl9 de un mamífero (por ejemplo, roedores tales como ratón, rata, o conejo, mono, vaca, caballo, cabra, ser humano, y similares) para inhibir la interacción entre Myl9 y CD69, y preferiblemente puede unirse a Myl9 humana para inhibir la interacción entre Myl9 humana y CD69 humana. "Inhibe la interacción entre Myl9 y CD69" significa aquí la desaparición o reducción de la interacción entre Myl9 y CD69. La interacción entre Myl9 y CD69 se puede evaluar midiendo el cambio en la función de CD69 que se produce como resultado de que Myl9 y CD69 actúan en coexistencia (por ejemplo, expresión o mejora de la función de CD69, o función fisiológica resultante del cambio en la función de CD69 debido a la acción de Myl9), o midiendo la migración de células CD4T que han expresado CD69 a la médula ósea.

50 En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo como se reivindica también puede unirse a Myl12a y/o Myl12b de un mamífero (por ejemplo, roedores tales como ratón, rata, o conejo, mono, vaca, caballo, cabra, ser humano, y similares) para inhibir la interacción entre Myl12a y/o Myl12b y CD69, y preferiblemente también puede unirse a Myl12a humana y/o Myl12b humana para inhibir la interacción entre Myl12a humana y/o Myl12b humana y CD69 humana. "Inhibe la interacción entre Myl12a y/o Myl12b y CD69" significa aquí la desaparición o reducción de la interacción entre Myl12a y/o Myl12b y CD69. La interacción entre Myl12a y/o Myl12b y CD69 se puede evaluar midiendo el cambio en la función de CD69 que se produce como resultado de que Myl12a y/o Myl12b y CD69 actúan en coexistencia (por ejemplo, expresión o mejora de la función de CD69, o función fisiológica resultante del cambio en la función de CD69 debido a la acción de Myl12a y/o Myl12b), o midiendo la migración de células CD4T que han expresado CD69 a la médula ósea.

65 El método empleado para medir la propiedad de unión al antígeno (tal como la afinidad de unión y la reactividad entre especies) del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser un método bien conocido en el campo por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión se puede medir con, pero sin limitarse a, el biosensor Biacore®, biosensor KinExA, ensayo de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN Inc.), citometría de flujo, extinción de fluorescencia, transición de fluorescencia, visualización de levadura, o

inmunotinción, y similares. La actividad neutralizante del anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo frente a la unión entre Myl9 y CD69 puede medirse con, pero no se limita a, biosensor Biacore®, ELISA, o citometría de flujo, y similares.

5 El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede ser preferiblemente cualquiera de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, o un fragmento de unión a Myl9 del mismo que se une a Myl9 u otras moléculas peptídicas que tienen la secuencia de aminoácidos de la región de unión de Myl9 contra dicho anticuerpo como se define en las reivindicaciones.

10 Un anticuerpo monoclonal aquí puede significar un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente uniformes. En otras palabras, los anticuerpos individuales contenidos en dicha población son idénticos excepto por una pequeña cantidad de mutantes naturales que pueden estar presentes. Un anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo sitio de antígeno. Además, a diferencia de un anticuerpo policlonal típico, que se dirige contra diferentes antígenos o diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único epítipo de un antígeno. El modificador "monoclonal" indica la propiedad de un anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente uniforme, y no debe entenderse que se limita a requerir la producción del anticuerpo mediante un método particular.

20 El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede ser aquí de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o una subclase de las mismas), y no se limita a una clase particular. Las inmunoglobulinas se clasifican en diferentes clases según la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de la cadena pesada (a veces denominada como la cadena H). Existen cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, algunas de las cuales pueden subdividirse en subclases (isotipos), tales como IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, e IgA<sub>2</sub>. La región constante de la cadena pesada correspondiente a las diferentes clases de inmunoglobulina se denomina  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Además, los tipos de cadena ligera (a veces denominada la cadena L) de un anticuerpo incluyen cadenas  $\lambda$  y  $\kappa$ .

25 En un aspecto, el anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo IgG, por ejemplo un anticuerpo IgG<sub>1</sub> o un anticuerpo IgG<sub>2</sub>, y similar. Además, el anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede estar en forma de monómero, dímero o multímero.

30 Un fragmento de unión a Myl9 aquí es un fragmento estructural y funcional de un anticuerpo anti-Myl9, y no está particularmente limitado siempre que posea la capacidad de unión a Myl9 y la secuencia según se reivindica. Los ejemplos de tal fragmento de unión a Myl9 pueden incluir, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, monocatenario (scFv), variantes de los mismos, una proteína de fusión o un péptido de fusión que comprende una porción de anticuerpo, otras estructuras modificadas de una molécula de inmunoglobulina que comprende el sitio de reconocimiento de Myl9, y similares.

35 El fragmento de unión a Myl9 de un anticuerpo anti-Myl9 se puede obtener mediante digestión proteolítica de un anticuerpo completo, por ejemplo mediante una proteasa tal como papaína o pepsina, o se puede producir directamente por una célula hospedante recombinante (por ejemplo, un eucariota tal como una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto, o una célula de mamífero, o un procariota tal como E. coli). Por ejemplo, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> puede formarse recolectando directamente fragmentos Fab'-SH de E. coli y sometiéndolos a unión química. F(ab')<sub>2</sub> también se puede formar usando una cremallera de leucina GCN4, que promueve el ensamblaje de moléculas F(ab')<sub>2</sub>. Además, se puede usar un sintetizador automático cuando se produce un scFv mediante una tecnología de síntesis química. Cuando se produce un scFv mediante una tecnología de recombinación genética, se puede introducir en una célula hospedante apropiada (por ejemplo, un eucariota, tal como una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto, o una célula de mamífero, o un procariota tal como E. coli) un plásmido apropiado que comprende un polinucleótido que codifica el scFv. El polinucleótido que codifica el scFv de interés puede producirse mediante una operación bien conocida, tal como la ligación de polinucleótidos. El scFv producido como resultado se puede aislar usando una tecnología de purificación de proteínas estándar muy conocida en la técnica.

40 Una región variable de un anticuerpo aquí significa la región variable de una cadena ligera de anticuerpo, la región variable de una cadena pesada de anticuerpo, o ambas. Además, una región constante de un anticuerpo aquí significa la región constante de una cadena ligera de anticuerpo, la región constante de una cadena pesada de anticuerpo, o ambas. La región variable de cadenas pesadas y ligeras consta cada una de cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres CDR, también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR de cada cadena son retenidas en la vecindad por las FR, y junto con las CDR en la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. La tecnología para determinar la CDR puede incluir, pero no se limita a, por ejemplo, (1) un enfoque basado en la variabilidad de la secuencia entre especies (tal como Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD); y (2) un enfoque basado en la investigación de la estructura cristalina de los complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al., 1997 J. Molec. Biol. 273:927-948). Estos u otros enfoques pueden emplearse en combinación.

65 El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención es un anticuerpo recombinante (tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano) o un anticuerpo

de mamífero no humano sintetizado químicamente, (por ejemplo, roedores tales como ratón, rata, o conejo, mono, vaca, caballo, cabra, y similares), o uno de sus fragmentos de unión a Myl9. El anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 de la presente invención es un anticuerpo humanizado o quimérico, preferiblemente un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo quimérico es, por ejemplo, un anticuerpo en el que la región variable de un anticuerpo no humano (tal como el de ratón o rata) se introduce en la región constante de un anticuerpo humano y, por ejemplo, se refiere a un anticuerpo en el que la región variable deriva de un anticuerpo no humano y la región constante deriva de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado es, por ejemplo, un anticuerpo en el que la región hipervariable de un anticuerpo no humano se introduce en un anticuerpo humano y, por ejemplo, se refiere a un anticuerpo en el que la CDR deriva de un anticuerpo no humano y las regiones restantes del anticuerpo derivan de un anticuerpo humano. Obsérvese que en la presente invención el límite entre un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado no necesariamente tiene que estar claro, y un anticuerpo puede estar en un estado que puede denominarse anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado. Un aspecto de un anticuerpo humanizado preferido aquí es un anticuerpo en el que la CDR deriva de un anticuerpo de roedor y las regiones restantes del anticuerpo derivan de un anticuerpo humano, particularmente de forma preferible un anticuerpo en el que la CDR deriva de un anticuerpo de ratón y las regiones restantes del anticuerpo derivan de un anticuerpo humano. La humanización también se puede llevar a cabo introduciendo la secuencia CDR derivada de un anticuerpo de, por ejemplo, un roedor en el sitio correspondiente de un anticuerpo humano con un método de injerto de CDR (véanse Jones et al., *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327(1988); y Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536(1988); Kontermann y Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Lab Manual (2001) y Tsurushita et al., *Methods* 36:69-83(2005)). En algunos casos, un anticuerpo humanizado también puede ser un anticuerpo humanizado en el que varios restos de aminoácidos en el FR se sustituyen por restos de aminoácidos derivados de un sitio similar en un anticuerpo no humano.

Puede ser importante para disminuir la antigenicidad que se seleccione el uso de regiones variables humanas tanto para cadenas ligeras como pesadas en la producción de un anticuerpo humanizado. La secuencia de aminoácidos de la región variable de roedores tales como anticuerpos de ratón, rata, o conejo se analiza frente a la biblioteca completa de secuencias FR humanas conocidas. A continuación, la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano que es la más cercana a la secuencia del anticuerpo de roedor se acepta como la FR humana del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, se puede utilizar como referencia O'Brien y Jones, *Antibody Engineering* (Springer Lab Manual), 567-590. En otro método, se emplea un marco particular derivado de una secuencia común a todos los anticuerpos humanos en un subgrupo particular de la cadena ligera o pesada. Puede emplearse el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes. Por ejemplo, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289(1992), y Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623-2632(1993) se pueden usar como referencia.

Además, es deseable que el anticuerpo humanizado en general retenga la alta afinidad de unión frente a antígenos y otras naturalezas biológicas preferidas. A fin de lograr este objetivo, según un método, el anticuerpo humanizado se prepara mediante una etapa de análisis de la secuencia original y varios productos humanizados conceptuales empleando un modelo tridimensional de la secuencia original y la secuencia humanizada. En general, está disponible para uso un modelo de inmunoglobulina tridimensional, y se conoce por los expertos en la técnica. Está disponible para uso un programa informático que ilustra y muestra una conformación tridimensional potencial de una secuencia de inmunoglobulina candidata seleccionada. Mediante la investigación de estas conformaciones tridimensionales ilustradas es posible el análisis de restos de aminoácidos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. Mediante este método, los restos de FR pueden diseñarse de modo que se logre la propiedad deseable del anticuerpo, tal como la retención de la afinidad de unión frente a uno o varios antígenos diana (tal como Myl9 o un fragmento del mismo).

Un anticuerpo en el que el anticuerpo quimérico o humanizado ejemplificado anteriormente se altera apropiadamente (por ejemplo, modificación del anticuerpo, o sustitución parcial, adición o eliminación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo) al tiempo que conserva la función de dicho anticuerpo (o con el fin de añadir o mejorar la función de dicho anticuerpo), y la secuencia según se reivindica, también está incluido en el anticuerpo de la presente invención. Específicamente, también se incluye en el alcance de la presente invención un anticuerpo en el que la lisina (Lys) ubicada en el carboxi terminal (C-terminal) de la cadena pesada se elimina mediante un método artificial tal como la modificación genética para reducir la falta de uniformidad de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos. Los ejemplos de otras sustituciones parciales pueden incluir, pero no se limitan a, un anticuerpo en el que el resto de aminoácido en la posición 234 de la cadena pesada se muta de valina (V) a alanina (A), un anticuerpo en el que el resto de aminoácido en la posición 237 en la cadena pesada se muta de glicina (G) a alanina (A), así como una combinación de los mismos, y similares. Obsérvese que dichas mutaciones se describen aquí como V234A y G237A, respectivamente.

El anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede modificarse como se desee siempre que se conserve la secuencia reivindicada. La modificación del anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede ser una modificación que cambia (a) la estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos en la región modificada, tal como la conformación de lámina o hélice; (b) el estado de carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) el efecto de la modificación en el mantenimiento del volumen de la cadena lateral, o alternativamente, se puede implementar una modificación en la que estos cambios no se observan claramente.

La modificación del anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención se puede lograr, por ejemplo, mediante sustitución, supresión, adición, y similares, de los restos de aminoácidos de configuración.

En la presente, un aminoácido se emplea en su significado más amplio e incluye, no solo los aminoácidos naturales tales como serina (Ser), asparagina (Asn), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), alanina (Ala), tirosina (Tyr), glicina (Gly), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y prolina (Pro), sino también aminoácidos no naturales tales como derivados y variantes de aminoácidos. Los expertos en la técnica reconocerán que a la luz de esta amplia definición, los ejemplos de aminoácidos aquí pueden incluir L-aminoácidos; D-aminoácidos; aminoácidos modificados químicamente tales como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos que no son materiales que configuran proteínas in vivo tales como norleucina,  $\beta$ -alanina, y ornitina; y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades de aminoácidos bien conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de un aminoácido no natural pueden incluir  $\alpha$ -metilaminoácidos (tal como  $\alpha$ -metilalanina), D-aminoácidos (tales como ácido D-aspártico y ácido D-glutámico), aminoácidos similares a histidina (tales como 2-aminohistidina,  $\beta$ -hidroxihistidina, homohistidina,  $\alpha$ -fluorometilhistidina, y  $\alpha$ -metilhistidina), aminoácidos que tienen un exceso de metileno en la cadena lateral (homoaminoácidos), y aminoácidos en los que el grupo funcional carboxilato del aminoácido en la cadena lateral está sustituido con un grupo sulfonato (tal como ácido cisteico).

Los restos de aminoácidos de origen natural se pueden clasificar, por ejemplo, en los siguientes grupos según las propiedades generales de la cadena lateral:

(1) Hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu e Ile;

(2) Hidrófilos neutros: Cys, Ser y Thr;

(3) Ácidos: Asp y Glu;

(4) Básico: Asn, Gln, His, Lys y Arg;

(5) Residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly y Pro; y

(6) Aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

Una sustitución no conservativa de la secuencia de aminoácidos que configura un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este se puede llevar a cabo intercambiando un aminoácido que pertenezca a uno de estos grupos por un aminoácido que pertenezca a otro grupo. Una sustitución más conservativa se puede llevar a cabo intercambiando un aminoácido que pertenezca a uno de estos grupos por otro aminoácido que pertenezca al mismo grupo. De forma similar, se puede llevar a cabo de forma adecuada una delección o sustitución de la secuencia de aminoácidos.

Una modificación del aminoácido que configura el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser, por ejemplo, una modificación postraduccional tal como glicosilación por un azúcar, acetilación, o fosforilación. El anticuerpo se puede glicosilar en una posición conservada en su región constante. La glicosilación de un anticuerpo se lleva a cabo habitualmente mediante una unión a través de N o una unión a través de O. N-enlazado significa la unión de un resto de azúcar a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína (donde X es cualquier aminoácido distinto de prolina) son secuencias de reconocimiento para añadir enzimáticamente un resto de azúcar a la cadena lateral de la asparagina. Un sitio de glicosilación potencial está presente cuando cualquiera de estas secuencias tripeptídicas está presente en el anticuerpo o en un fragmento de unión a antígeno del mismo. La O-glicosilación puede ser la unión de N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxí aminoácido (tal como serina o treonina), y en algunos casos puede ser la unión a 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina. Las condiciones de glicosilación (por ejemplo, cuando la glicosilación se lleva a cabo con un medio biológico, el tipo de célula hospedadora o medio celular, pH y similares) pueden ser seleccionadas adecuadamente por los expertos en la técnica de acuerdo con el objetivo.

El anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 de la presente invención puede modificarse adicionalmente basándose en el sentido común técnico bien conocido por los expertos en la técnica mediante otros métodos de modificación, solos o en combinación, siempre que se conserve la secuencia reivindicada.

El anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención se puede producir mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo se puede producir con un hibridoma que produce el anticuerpo Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención, o el anticuerpo se puede producir integrando el gen que codifica el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención en un vector de expresión, e introduciendo dicho vector de expresión en células de E. coli, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), y similares. El gen que codifica el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención posee preferiblemente un ADN que codifica una secuencia señal, y posee más preferiblemente un ADN que codifica una secuencia señal en el extremo 5' del ADN

- que codifica la región variable de la cadena pesada y del ADN que codifica la región variable de la cadena ligera. Una secuencia señal son restos de aminoácidos que están presentes en el extremo N de una proteína que es necesaria para que una proteína secretora o una proteína de membrana integral pase a través de la bicapa lipídica después de sintetizarse en el ribosoma. Una secuencia señal aquí no está particularmente limitada, siempre que sea una
- 5 secuencia que posea esta función. Una secuencia señal que puede estar contenida en el anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede incluir secuencias señal derivadas de seres humanos, ratones, ratas, conejos, burros, cabras, caballos, aves, perros, gatos, levaduras, y similares. Un aspecto específico de la secuencia señal puede incluir un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 12 como la secuencia señal relacionada con la cadena pesada y un péptido que comprende la
- 10 secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 14 como la secuencia señal relacionada con la cadena ligera. Además, la sustitución, adición o eliminación de uno o múltiples (tales como 2, 3, 4 o 5) aminoácidos pueden estar presentes en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 12 o la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 14, siempre que sea funcionalmente equivalente.
- 15 El anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención pueden ser aquellos que se aíslan o purifican según métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En la presente, «aislado» o «purificado» se refiere a que se ha aislado o purificado artificialmente a partir del estado natural. Cuando una molécula o una composición se produce de forma natural, significa que está "aislada" o "purificada" cuando se ha cambiado o se elimina de un entorno en el que existe originalmente, o ambos. Los ejemplos de un método de aislamiento o
- 20 purificación pueden incluir, pero no se limitan a, electroforesis, medios biológicos moleculares, inmunológicos, o cromatográficos, y similares, específicamente, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, o cromatografía HPLC de fase inversa, o enfoque isoeléctrico, y similares.
- 25 Aquí, un "inhibidor de punto de control inmunitario" significa un inhibidor contra una molécula de punto de control inmunitario que participa en un mecanismo de punto de control inmunitario, un sistema para suprimir la activación de células T, e incluye un inhibidor de PD-1 y un inhibidor de CTLA-4. La expresión "molécula de punto de control inmunitario" abarca tanto receptores como ligandos que funcionan como puntos de control inmunitario.
- 30 Aquí, la expresión "usado en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario" significa que una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 de la presente invención y un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable se administran casi al mismo tiempo con un inhibidor del punto de control inmunitario a un paciente con un tumor, como parte de un régimen terapéutico. La composición farmacéutica y el inhibidor del punto de control inmunitario se pueden administrar al paciente simultáneamente, por separado, de forma continua, o en intervalos de tiempo, con una cantidad eficaz de cada uno, cuando se administran
- 35 en combinación. El régimen terapéutico puede incluir otro agente anticanceroso. La composición farmacéutica y el inhibidor del punto de control inmunitario se pueden administrar al paciente en ciclos de administración separados. Si la composición farmacéutica y el inhibidor del punto de control inmunitario se administran simultáneamente, se puede administrar una única preparación de combinación que los comprenda.
- 40 Aquí, un "inhibidor de PD-1" significa una sustancia que actúa directa o indirectamente sobre PD-1 para inhibir la acción supresora de células T de PD-1. El inhibidor de PD-1 incluye un compuesto de bajo peso molecular, un péptido, y un anticuerpo anti-PD-1 que se une a PD-1 para inhibir su acción supresora de células T, así como un compuesto de bajo peso molecular, un péptido, y un anticuerpo anti-PD-L1 que se une a PD-L1, e inhibe su actividad de unión a PD-1 para inhibir la acción supresora de células T de PD-1. El anticuerpo anti-PD-1 no se limita a, sino que incluye pembrolizumab, nivolumab y MEDI0680 (AMP-514). El anticuerpo anti-PD-L1 no se limita a, sino que incluye atezolizumab, durvalumab y avelumab.
- 45 Aquí, un "inhibidor de CTLA-4" significa una sustancia que actúa sobre CTLA-4 para inhibir la acción supresora de células T de CTLA-4. El inhibidor de CTLA-4 incluye un compuesto de bajo peso molecular, un péptido, y un anticuerpo anti-CTLA-4 que se une a CTLA-4 para inhibir su acción supresora de células T. El anticuerpo anti-CTLA-4 no se limita a ipilimumab y tremelimumab, sino que los incluye.
- 50 Aquí, "linfoma maligno" significa un grupo de tumores malignos sanguíneos que se desarrollan a partir de tejidos linfáticos. El linfoma maligno incluye el linfoma de Hodgkin y el linfoma no de Hodgkin, y el último incluye el linfoma difuso de células B grandes, y similares.
- 55 Aquí, "cáncer de cabeza y cuello" significa una expresión general de tumor maligno que se desarrolla en la región desde la cara hasta el cuello, e incluye como parte el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello.
- 60 Aquí, "cáncer urotelial" significa tumor maligno epitelial que se desarrolla a partir de células uroteliales, e incluye cáncer pélvico renal, cáncer del tracto urinario, y cáncer de vejiga como términos más específicos.
- Aquí, "cáncer de mama" significa un carcinoma que se desarrolla en los tejidos mamarios. Parte del cáncer de mama es el cáncer de mama triple negativo que no expresa receptores de estrógeno, receptores de progesterona, y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2).
- 65



En la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo según se reivindica tiene la siguiente CDR:

- (a) una CDR1 de cadena pesada que consiste en un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 28;
- (b) una CDR2 de cadena pesada que consiste en un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 30;
- (c) una CDR3 de cadena pesada que consiste en un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 32;
- (d) una CDR1 de cadena ligera que consiste en un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 33;
- (e) una CDR2 de cadena ligera que consiste en un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 34; y
- (f) una CDR3 de cadena ligera que consiste en un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 35.

En la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo comprende cadenas pesada y ligera, la región variable de dicha cadena pesada comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NOs. 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, o 64, y la región variable de dicha cadena ligera comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NOs. 65, 66, 67, o 68, en las combinaciones reivindicadas.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de dicha cadena pesada o ligera puede comprender la sustitución, adición, o supresión de uno o múltiples aminoácidos en dicha secuencia, siempre que se conserve la secuencia reivindicada. Como se usa aquí, "múltiple" no está limitado, siempre que se conserve la afinidad de unión contra Myl9 y se inhiba la interacción entre Myl9 y CD69, y es 2 a 15, más preferiblemente 2 a 10, por ejemplo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos de la región variable de dicha cadena pesada o ligera comprende un péptido representado por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, por ejemplo 91%, 92%, 93%, 94%, o 95% de homología con dicha secuencia.

En la presente invención, el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo es un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y cadena ligera que consisten en las siguientes combinaciones.

- (1) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 64, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;
- (2) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 63, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;
- (3) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 56, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;
- (4) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 57, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;
- (5) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 55, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;
- (6) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 58, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;
- (7) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 59, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66;

- [illegible]

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 de la presente invención.

La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 de la presente invención en una forma de preparación acuosa o seca puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un excipiente, y/o un estabilizador. Los ejemplos de un vehículo, excipiente, o estabilizador aceptable incluyen disolución salina; un amortiguador tal como ácido fosfórico, ácido cítrico, u otros ácidos orgánicos; un antioxidante que incluye ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular; una proteína (tal como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulina); un polímero hidrófilo tal como polivinilpirrolidona; un aminoácido; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; un quelante tal como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; un contraión que forma una sal tal como sodio; o un tensioactivo no iónico tal como TWEEN™, PLURONICS™, o PEG.

La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 de la presente invención se puede encapsular, por ejemplo, en una microcápsula, en un sistema de administración de fármacos coloidal (tal como un liposoma, una microesfera de albúmina, una microemulsión, una nanopartícula, o una nanocápsula), o en una macroemulsión. Cuando se desea una administración de liberación sostenida del anticuerpo en un preparado que tenga una propiedad de liberación adecuada para cualquier enfermedad que requiera la administración del anticuerpo, se puede diseñar una microencapsulación del anticuerpo. Los ejemplos de una matriz de liberación sostenida incluyen un poliéster, un hidrogel (tal como poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl) o poli(alcohol vinílico)), ácidos polilácticos, un copolímero de ácido L-glutámico y y etil-L-glutamato, un etileno-acetato de vinilo no degradable, un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico degradable tal como LUPRON DEPOT™ (una microesfera inyectable compuesta por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Como se describió anteriormente, el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede inhibir la interacción entre Myl9 y CD69. En consecuencia, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 de la presente invención puede ser útil para tratar una enfermedad atribuida a la interacción entre Myl9 y CD69, por ejemplo inflamación alérgica de las vías respiratorias tales como asma, rinitis alérgica crónica, o alguna sinusitis, enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias tales como sinusitis no incluida en la inflamación alérgica de las vías respiratorias, y enfermedad inflamatoria intestinal tal como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad de Behcet, y disfunción gastrointestinal eosinofílica.

En otro aspecto, la presente invención engloba el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 para uso en un método para tratar la enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias o la enfermedad inflamatoria intestinal.

Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 de la presente invención puede ser útil para tratar tumores tales como cáncer colorrectal, melanoma maligno, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales, linfoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de pulmón microcítico, mesotelioma, y cáncer de endometrio, cuando se combina con un inhibidor del punto de control inmunitario.

En otro aspecto, la presente invención engloba el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 para uso en un método para tratar el cáncer colorrectal, para administrarlo en combinación con un anticuerpo anti-PD-1.

Cuando la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 se usa en combinación con el inhibidor del punto de control inmunitario para tratar un tumor, el anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 es preferiblemente un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo que también inhibe la interacción entre Myl12a y/o Myl12b y CD69.

El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede emplearse en un método terapéutico solo o en combinación con otros agentes o composiciones (en el método de tratamiento de tumores, el anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención se administra en combinación con el inhibidor del punto de control inmunitario). Por ejemplo, el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención se puede administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes con otro agente. Tal terapia de combinación comprende la administración combinada (dos o más agentes están contenidos en la misma preparación o en una preparación separada) y la administración separada (por ejemplo, al mismo tiempo o secuencialmente). Cuando dos o más agentes se administran por separado, la administración del anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención puede ser antes o después del método terapéutico que lo acompaña.

El sujeto al que se administra la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión a Myl9 del mismo de la presente invención no está limitado, y la presente invención se emplea para un ser humano o un mamífero no humano (roedores tales como ratón, rata, o conejo, mono, vaca, caballo, cabra, y similares).

El método de administración de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Myl9 o el fragmento de unión de Myl9 del mismo de la presente invención a un sujeto (tal como la vía de administración, la dosis, la frecuencia de administración por día, y el momento de la administración) no está limitado, y puede ser determinado

apropiadamente por los expertos en la técnica (como un médico) según el estado de salud del sujeto, la extensión de la enfermedad, el tipo de agente usado en combinación, y similares.

La bibliografía citada aquí se proporciona únicamente con el fin de describir la tecnología relacionada anterior a la fecha de presentación de la presente solicitud, y no debe interpretarse como una admisión por parte de los presentes inventores de que la presente invención no tiene el derecho de preceder a dichas descripciones debido a invenciones anteriores o por cualquier otra razón. Todas las descripciones de estos textos se basan en la información disponible para los presentes solicitantes, y de ninguna manera configuran el reconocimiento de que estas descripciones son correctas.

Los términos utilizados aquí se emplean para describir realizaciones particulares, y no pretenden limitar la invención.

A menos que el contexto indique claramente que debe entenderse de otro modo, el término "comprende", como se usa aquí, tiene la intención de la presencia de los elementos descritos (tales como componentes, etapas, elementos, o números), y no excluye la presencia de otros elementos (tales como componentes, etapas, elementos, y números). La expresión "consiste en" engloba aspectos descritos por las expresiones "que consiste en" y/o "consiste esencialmente en".

La expresión "actividad neutralizante", como se usa aquí, significa la actividad para inhibir la unión entre Myl9 y CD69, y/o la actividad para reducir la transducción de señales, la respuesta de expresión molecular, o el cambio de funcionalidad de la célula que se induce dentro del cuerpo humano debido a la interacción entre Myl9 y CD69.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos utilizados en la presente (incluidos los términos técnicos y científicos) tienen los mismos significados que los que reconocen por lo general los expertos en la materia de la tecnología a la que pertenece la presente invención. Los términos utilizados aquí, a menos que se defina explícitamente de otra manera, deben interpretarse con significados consistentes con los significados aquí y en campos técnicos relacionados, y no deben interpretarse con significados idealizados o excesivamente formales.

Términos tales como primero y segundo se emplean para representar diversos elementos, y debe reconocerse que estos elementos no deben estar limitados por estos mismos términos. Estos términos se emplean únicamente con el fin de discriminar un elemento de otro, y es posible, por ejemplo, describir un primer elemento como un segundo elemento, y de manera similar, describir un segundo elemento como un primer elemento sin salirse del alcance de la presente invención.

Los valores numéricos empleados aquí para indicar el contenido del componente o el intervalo de valores numéricos y similares, a menos que se indique explícitamente, deben entenderse modificados por el término "alrededor de". Por ejemplo, a menos que se indique explícitamente, se reconoce que "4°C" significa "alrededor de 4°C", y los expertos en la técnica pueden reconocer de forma natural y razonable el alcance del mismo según el sentido común técnico y el contexto de la presente memoria descriptiva.

A menos que se indique claramente que significa otra cosa en el contexto, cuando se utilice en la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la presente, se debe reconocer que cada aspecto representado en forma singular también puede ser una forma plural siempre que no se contradiga técnicamente, y viceversa.

A continuación, la presente invención se describirá más detalladamente haciendo referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención se puede realizar mediante varios aspectos, y no debe interpretarse como limitada a los ejemplos descritos aquí.

## Ejemplos

### **Ejemplo 1: Producción de anticuerpo monoclonal anti-Myl9 de ratón/humana Producción de anticuerpo monoclonal de ratón anti-Myl9 de ratón/humana**

Con el fin de producir un anticuerpo monoclonal contra Myl9 de ratón (número de acceso de Genbank NP\_742116.1, SEQ ID NO. 1) y Myl9 humana (número de acceso de Genbank NP\_006088.2, SEQ ID NO. 2), se prepararon mediante las siguientes etapas un péptido que tiene cisteína (Cys) añadido al extremo C de la secuencia N-terminal común a Myl9 de ratón y Myl9 humana (posiciones 1 - 27) (en lo sucesivo denominado péptido Myl9 de ratón/humana) (SEQ ID NO. 3) y una proteína que tiene hemocianina de lapa californiana (KLH) fusionada al mismo (denominada en lo sucesivo "péptido de Myl9 de ratón/humana-KLH"). En la Figura 1-1A se muestra la comparación de las secuencias de Myl9 de ratón y Myl9 humana.

En primer lugar, se sintetizó el péptido Myl9 de ratón/humana (SEQ ID NO. 3) enviándolo a TORAY Research Center, Inc., y se produjo el péptido Myl9 de ratón/humana-KLH con el Imject Maleimide-Activated mKLH Spin Kit (Thermo Fisher Scientific).

Se mezclaron diez microgramos de péptido Myl9 de ratón/humana-KLH con la misma cantidad de adyuvante GERBU (GERBU Biotechnik GmbH), y se inyectaron por vía subcutánea en la almohadilla de la pata de ratones C57BL/6J. Después, el péptido Myl9 de ratón/humana-KLH se administró de manera similar los Días 3, 7 y 10. Se usó adyuvante GERBU (GERBU Biotechnik GmbH) los Días 3 y 10. Los ratones se sacrificaron el Día 13, y los ganglios linfáticos periféricos se recolectaron para preparar las células de los ganglios linfáticos. En presencia de GenomeONE-CF (Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.), las células de los ganglios linfáticos preparadas y las células de mieloma P3U1 (donadas por el profesor Jun Shimizu, Universidad de Kyoto) se fusionaron en una relación de 5:1. Dichas células fusionadas se cultivaron en una placa de plástico de 96 pocillos. Después de 7 días de incubación (5% de CO<sub>2</sub>, 37°C), se recogió el sobrenadante del cultivo.

Con el sobrenadante de cultivo obtenido, se recogieron pocillos que tenían reactividad frente al péptido Myl9 de ratón/humana, así como actividad inhibidora frente a la unión entre la proteína de la región extracelular CD69 de ratón y Myl9 de ratón.

La reactividad contra el péptido Myl9 de ratón/humana se evaluó mediante ELISA con una proteína que tiene seroalbúmina bovina (BSA) fusionada con el péptido Myl9 de ratón/humana (SEQ ID NO. 3) (en lo sucesivo, péptido Myl9 de ratón/humana-BSA).

El péptido Myl9 de ratón/humana (SEQ ID NO. 3) se sintetizó enviándolo a TORAY Research Center, Inc., y el péptido-BSA de Myl9 de ratón/humana se produjo con el Imject Maleimide-Activated BSA Spin Kit (Thermo Fisher Scientific).

Se donó de la Universidad de Chiba un plásmido que codifica la proteína de la región extracelular CD69 de ratón (posiciones 62-199) (SEQ ID NO. 4), que tiene una etiqueta Flag añadida al extremo N (en lo sucesivo 3 x Flag-CD69 EC de ratón), y se transfectó en células Expi293F (Invitrogen/LifeTechnologies) con el ExpiFectamine 293 Transfection Kit (Thermo Fisher Scientific/Gibco). Después de 4 días de incubación (8% de CO<sub>2</sub>, 37 °C), se recolectó el sobrenadante del cultivo. A partir del sobrenadante del cultivo recogido, se purificaron 3 x Flag-CD69 EC de ratón con Anti-Flag M2 Affinity Gel (SIGMA). Después de la purificación, se realizó un tratamiento de escisión de la cadena de azúcar con PNGase F (New England BioLabs).

Para la glutationa-S-transferasa (GST)-His-Myl9 de ratón (en lo sucesivo, GST-His Myl9 de ratón), un plásmido donado de la Universidad de Chiba se expresó en E. coli BL21-Gold (DE3) pLys (Agilent Technologies), y se purificó con Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare).

Se llevó a cabo un ELISA empleando péptido Myl9 de ratón/humana-BSA según las siguientes etapas. Se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) con péptido Myl9 de ratón/humana-BSA. Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20 al 0,02%/PBS, se añadió a los pocillos el sobrenadante del cultivo de dichas células fusionadas. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces, se añadió anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

La evaluación de la actividad inhibidora frente a la unión entre la proteína de la región extracelular CD69 de ratón y Myl9 de ratón se llevó a cabo según las siguientes etapas. Se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) con GST-His-Myl9 de ratón. Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20 al 0,02%/PBS, se añadió a los pocillos el sobrenadante del cultivo de dichas células fusionadas. Esto se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió a los pocillos 3 x Flag-CD69 EC de ratón sometido a tratamiento de escisión de cadena de azúcar. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces, se añadió anticuerpo anti-Flag marcado con peroxidasa de rábano picante (SIGMA), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

Los hibridomas se clonaron de pocillos recogidos a través de las etapas anteriores limitando el método de dilución para obtener finalmente un clon de hibridoma que expresa anticuerpo de ratón anti-Myl9 de ratón/humana que tiene actividad de reacción contra el péptido Myl9 de ratón/humana, así como actividad inhibidora frente a la unión entre la proteína de la región extracelular CD69 de ratón y Myl9 de ratón.

El clon de hibridoma obtenido se cultivó, y el anticuerpo anti-Myl9 de ratón/humana ("Anticuerpo A" (algunas veces descrito como "mAb A")) se purificó del sobrenadante del cultivo con Proteína A (GE Healthcare). El isotipo del anticuerpo A se determinó con el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales (Serotec) como IgG2c, k.

### **Análisis de la capacidad de unión del Anticuerpo A contra la proteína Myl9 de ratón/humana**

La capacidad de unión del Anticuerpo A contra Myl9 humana y de ratón se evaluó mediante ELISA. Siguiendo las etapas a continuación, se produjeron las proteínas que tienen una etiqueta de histidina unida al extremo C de cada uno de Myl3 de ratón (No. de acceso Genbank NP\_034989.1, SEQ ID NO. 5), Myl9 de ratón, Myl3 humana (No. de acceso Genbank NP\_000249.1, SEQ ID NO. 6), y Myl9 humana (en lo sucesivo denominados respectivamente Myl3 de ratón-His, Myl9 de ratón-His, Myl3 humana-His, y Myl9 humana-His). Se muestra la comparación de secuencias de aminoácidos entre Myl3 de ratón y Myl3 humana (Figura 1-1B), Myl3 de ratón y Myl9 de ratón (Figura 1-2C), así como Myl3 humana y Myl9 humana (Figura 1-2D).

Los genes que codifican las proteínas Myl3 de ratón y Myl9 de ratón se donaron por la Universidad de Chiba. Los genes que codifican las proteínas Myl3 humana y Myl9 humana se amplificaron a partir de ADNc de corazón humano mediante PCR. Estos genes se insertaron en el sitio BglII/BamHI de un vector pET42b (Merck) que tenía insertado el gen que codifica la secuencia de escisión de PreScission Protease (GE Healthcare). El vector producido se transformó en la cepa de *E. coli* BL21-Gold (DE3) pLys (Agilent Technologies) para permitir la expresión de Myl3 de ratón-His, Myl9 de ratón-His, Myl3 humana-His, y Myl9 humana-His con una etiqueta GST adjunta. Las proteínas expresadas se purificaron con Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare), la etiqueta GST se cortó con PreScission Protease, y Myl3 de ratón-His, Myl9 de ratón-His, Myl3 humana-His, y Myl9 humana-His se purificaron con TALON Superflow Metal Affinity Resin (CLONTECH).

La capacidad de unión contra Myl9 de ratón/humana se evaluó siguiendo las etapas a continuación mediante ELISA. Se revistieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) con Myl3 de ratón-His, Myl9 de ratón-His, Myl3 humana-His, y Myl9 humana-His. Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20 al 0,02%/PBS, se realizaron diez diluciones en serie de cuatro veces del Anticuerpo A a partir de una concentración de 10 µg/ml, y se añadieron a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces, se añadió anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

El anticuerpo A mostró una unión dependiente de la concentración a Myl9 de ratón y humana, pero no se unió a Myl3 de ratón y humana, que tiene una homología baja con Myl9 de ratón y humana (Figura 2).

### **Evaluación de la actividad inhibidora del Anticuerpo A frente a la unión entre la proteína de la región extracelular CD69 de ratón y Myl9 de ratón**

La evaluación de la actividad inhibidora del Anticuerpo A frente a la unión entre la proteína de la región extracelular CD69 de ratón y Myl9 de ratón se realizó mediante ELISA competitivo. En primer lugar, se produjeron la proteína de la región extracelular CD69 de ratón y la proteína Myl9 de ratón.

Específicamente, cada Myl3 y Myl9 de ratón se clonaron a partir del ADNc de la médula ósea y tejido del músculo cardíaco, y se insertaron en el sitio de multiclonación del vector pET42b (Merck). El vector de expresión producido se transformó en células competentes de Rosetta (Merck), y se seleccionaron los clones que poseían el vector de expresión. Cada uno de los medios de cultivo de clones precultivados se añadió a 500 ml de disolución de LB que comprende kanamicina, y se cultivó en un agitador a 37°C. Se añadió IPTG (Nacalai) a una concentración final de 1 mM a OD<sub>600</sub> = 0,4, y se llevó a cabo la expresión inducida de proteínas Myl3 y Myl9 de ratón durante 3 horas a 37°C. Después de 3 horas, las células se recogieron por centrifugación, se lisaron con un amortiguador de lisis [Tris-HCl (pH 8,0) y NaCl 150 mM], y después se homogeneizaron con un sonicador mientras se enfriaban en hielo. La fracción insoluble se eliminó por centrifugación, se pasó por un filtro de 0,45 µm (Corning), y después se purificó con una columna empacada con perlas de Ni-NTA (QIAGEN). Las perlas se lavaron con un amortiguador de lavado [Tris-HCl (pH 8,0), NaCl 150 mM, e imidazol 10 mM], y a continuación la proteína unida se eluyó con un amortiguador de elución [Tris-HCl (pH 8,0), NaCl 150 mM, e imidazol 500 mM]. Las proteínas GST-His-Myl3 de ratón y GST-His-Myl9 de ratón obtenidas se sometieron a desplazamiento de disolución a PBS con PD10 (GE Healthcare). Se empleó disolución de Bradford (BIO-RAD) para medir la concentración de la proteína purificada.

A continuación, se realizó un ELISA para analizar la presencia o ausencia de asociación entre Myl9 de ratón y CD69 de ratón (Figuras 3A y 3B). Específicamente, se añadieron la proteína GST-His-Myl3 de ratón y la proteína GST-His-Myl9 de ratón a una concentración de 5 µg/ml, y se incubaron durante la noche a 4°C para inmovilizarlas en una placa ELISA. Al día siguiente, se empleó Block Ace (Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.) para permitir el bloqueo a temperatura ambiente durante una hora, y después se lavó tres veces con un amortiguador de lavado (HEPES 50 mM (pH 6,5), NaCl 150 mM, y Tween 20 al 0,02%). Se añadió a cada pocillo una concentración diferente de proteína 3 x Flag CD69 EC de ratón, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante una hora y media. En la Figura 3B, se empleó proteína 3 x Flag CD69 EC de ratón, en la que la cadena de azúcar unida a N se escindió con PNGase F (NEB). El tratamiento de escisión de la cadena de azúcar unida a N se realizó empleando 1.000 U de PNGase F para

4 µg de proteína 3 x Flag CD69 EC de ratón. Después de lavar tres veces con el amortiguador de lavado, se añadió el anticuerpo anti-Flag (M2) marcado con HRP (Sigma), se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante una hora, y después se lavó cinco veces con el amortiguador de lavado. Se usó disolución de TMB (BIO-RAD) como sustrato colorante, y la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> IN. Se empleó SpectraMAX Paradigm (Molecular Device) para medir el valor a 450 nm.

Como se muestra en las Figuras 3A y 3B, se detectó significativamente la unión dependiente de la concentración de CD69 de ratón a Myl9 de ratón.

Se realizó un ELISA competitivo para evaluar la actividad inhibidora del Anticuerpo A frente a la unión entre la proteína de la región extracelular CD69 de ratón y Myl9 de ratón. Específicamente, la proteína GST (Abcam) y la proteína GST-His-Myl9 de ratón se añadieron a una placa recubierta con glutationa (Thermo), para inmovilizarlas. Cada pocillo se bloqueó con Block Ace a temperatura ambiente durante una hora, y después se lavó tres veces con el amortiguador de lavado (PBS y Tween 20 al 0,02%). Se añadieron el Anticuerpo A y el anticuerpo policlonal anti-Myl9/12 a las concentraciones descritas en la Figura 3C, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió proteína 3 x Flag CD69 EC de ratón tratada con PNGase F, se hizo reaccionar durante la noche a 4°C, y se lavó tres veces con el amortiguador de lavado. Se añadió anticuerpo anti-Flag (M2) marcado con HRP (Sigma), se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante una hora, y después se lavó cinco veces con el amortiguador de lavado. Se usó disolución de TMB (BIO-RAD) como sustrato colorante, y la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> IN. Se empleó SpectraMAX Paradigm (Molecular Device) para medir el valor a 450 nm.

Como se muestra en la Figura 3C, la unión entre CD69 de ratón y Myl9 de ratón dependía de la concentración, y se inhibía significativamente en presencia del Anticuerpo A. Esta actividad inhibidora tendía a ser mayor que la de un anticuerpo policlonal anti-Myl9/12.

#### **Análisis de secuencia del Anticuerpo A**

Las secuencias de ADN que codifican la secuencia señal de las cadenas pesada y ligera, así como la región variable del Anticuerpo A, se amplificaron mediante el método 5'-RACE (amplificación rápida 5' de extremos de ADNc). El ARN total se preparó a partir de dicho hibridoma con RNeasy Mini Kit (QIAGEN), y se trató con ADNasa (QIAGEN, RNase free DNase set). Se preparó ADNc bicatenario a partir de dicho ARN total con el cDNA Synthesis Kit (TAKARA). Se añadió a dicho ADNc el adaptador 5' obtenido hibridando oligoDNA ad29S (ACATCACTCCGT) (SEQ ID NO. 7) y oligoDNA ad29AS (ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT) (SEQ ID NO. 8). El ADNc obtenido se amplificó con el cebador directo 5' (cebador 5'-PCR4, AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG) (SEQ ID NO. 9), y se empleó el cebador inverso 3' (GCCAGTGGATAGACTGATGG (GCCAGTGGATAGACTGATGG (SEQ ID NO. 10) para amplificar la cadena pesada de IgG de ratón, y se empleó GATGGATACAGTTGGTGCAGC (SEQ ID NO. 11) para amplificar la cadena ligera de Igk de ratón). El ADNc amplificado se insertó en el vector pCR2.1 (Invitrogen/LifeTechnologies). La secuencia génica del Anticuerpo A se analizó con ABI3130XL (SEQ ID NOs. 12 - 19).

Las secuencias de longitud completa de las cadenas pesada y ligera del Anticuerpo A se obtuvieron mediante las siguientes etapas. El ARN total se preparó a partir de dicho hibridoma con RNeasy Mini Kit (QIAGEN), y se trató con ADNasa (QIAGEN, RNase free DNase set). El ADNc se preparó a partir de dicho ARN total con cDNA Synthesis Kit (TAKARA). Con el ADNc obtenido como molde, las secuencias génicas que codifican las cadenas pesada y ligera del Anticuerpo A se amplificaron mediante PCR con el cebador directo 5' (GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTCTTTC (SEQ ID NO. 20) usado para amplificar la cadena pesada, y GCGAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG (SEQ ID NO. 21) usado para amplificar la cadena ligera) y con el cebador inverso 3' (GCGGAATTCATCATTTACCCAGAGACCGGGAGATGG (SEQ ID NO. 22) usado para amplificar la cadena pesada, y GCGGAATTCATACTCATTCTCTGTTGAAGCTCTTGAC (SEQ ID NO. 23) usado para amplificar la cadena ligera), y cada uno se clonó en los vectores pEE6.4 y pEE12.4 (Lonza). Las secuencias génicas se analizaron con ABI3130XL (SEQ ID NOs. 12 - 19 y 24 - 27).

Para la CDR del Anticuerpo A, la secuencia de aminoácidos del Anticuerpo A se numeró según el sistema de numeración de Kabat con el software Abysis (patentado por UCL), y en función de esta numeración, la CDR se determinó según la definición de Kabat o el método de definición de AbM para la identificación de CDR (SEQ ID NOs. 28 - 43).

#### **Ejemplo 2: Evaluación del efecto del fármaco del Anticuerpo A en el modelo de inflamación de las vías respiratorias del ratón inducida por OVA**

El efecto de la administración *in vivo* de anticuerpo de ratón purificado anti-Myl9 de ratón/humana (Anticuerpo A) sobre la inflamación alérgica de las vías respiratorias se verificó con un modelo de inflamación de las vías respiratorias inducida por OVA.

En primer lugar, se investigó el efecto supresor de la administración del Anticuerpo A contra la infiltración celular alrededor del tubo bronquial que se induce en el momento de la inflamación de las vías respiratorias. Específicamente,

se administraron intraperitonealmente a ratones BALB/c de tipo salvaje 100 µg/ratón (SIGMA) de ovoalbúmina (OVA) con 4 mg/ratón de Alum (Thermo) para la inmunización. El día de la primera administración se fijó como el Día 0, y la segunda administración se realizó el Día 7. La inflamación de las vías respiratorias se indujo sometiendo a los ratones a inhalación nebulizada de una disolución de OVA al 1% (10 mg/ml de disolución salina) durante 30 minutos con un nebulizador de ondas ultrasónico (Omron) los Días 14 y 16 (inhalación de OVA). Se preparó un grupo sin inhalación de OVA como grupo control (Sin inhalación). El anticuerpo A, o anticuerpo IgG2a, κ de ratón (BioLegend) para el control se administraron por vía intraperitoneal a 100 µg cada uno los Días 13 y 15. El Día 18, el pulmón del ratón se resecó, se fijó con disolución de formalina al 10%, y después se incrustó en parafina para producir secciones de tejido, y se llevó a cabo la tinción con hematoxilina/eosina (tinción H & E) y tinción con PAS (ácido peryódico de Schiff) (Figura 4-1A).

Como se muestra en la Figura 4-1A, se observó una infiltración celular severa alrededor del tubo bronquial en el grupo de administración de anticuerpos de control que inhaló OVA, pero la infiltración celular se suprimió significativamente en el grupo de administración de Anticuerpo A que inhaló OVA (Figura 4-1A parte superior). Además, se observó producción de mucosidad que se tiñó positivamente para PAS dentro del tubo bronquial en el grupo de administración de anticuerpos de control que inhaló OVA, pero la producción de mucosidad también se suprimió significativamente en el grupo de administración de Anticuerpo A que inhaló OVA (Figura 4-1A parte inferior).

Posteriormente, se realizó un lavado broncoalveolar el Día 17 después de la inducción de la inflamación de las vías respiratorias, y se comparó el número de células infiltrantes y tipos de células infiltrantes observados en el líquido de lavado broncoalveolar (BALF) entre el grupo de administración del Anticuerpo A y el grupo de administración del anticuerpo de control. El lavado broncoalveolar se realizó mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital Na (70 - 90 mg/kg) a ratones para la anestesia, y luego se hizo una incisión en las vías respiratorias para insertar una cánula (Becton Dickinson) e inyectar disolución salina (Otsuka Pharmaceutical) en el pulmón para recolectar las células. Se contó el número de células para las células recogidas (todas las células). Además, estas células se suspendieron en suero fetal bovino (FCS) y se pegaron en un portaobjetos con Cytospin 3 (Thermo Fisher Scientific). Se empleó el reactivo May-Gruenwald Giemsa (MERCK) para la tinción, y las células se identificaron en eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos según criterios morfológicos.

Como se muestra en la Figura 4-1B, el número total de células infiltrantes disminuyó significativamente, y el número de varias células de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos también disminuyó significativamente en el grupo de administración del Anticuerpo A en comparación con el grupo de administración del anticuerpo de control.

Posteriormente, se compararon varias citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y RANTES) contenidas en el líquido de lavado broncoalveolar recolectado entre el grupo de administración del Anticuerpo A y el grupo de administración del anticuerpo de control. Se usó Cytometric Bead Array (BD Biosciences) para la medida.

Como se muestra en la Figura 4-1C, la producción de cualquiera de las citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y RANTES) se redujo en el grupo de administración del Anticuerpo A en comparación con el grupo de administración del anticuerpo de control.

Posteriormente, se comparó la resistencia de las vías respiratorias inducida por metacolina el Día 17 después de la inducción de la inflamación de las vías respiratorias entre el grupo de administración del anticuerpo A (Figura 4-2D), el grupo de administración del anticuerpo policlonal anti-Myl9/12 (Figura 4-2E), y los grupos de administración de anticuerpos de control.

Como se muestra en la Figura 4-2D, la resistencia de las vías respiratorias se elevó de forma dependiente de la concentración de metacolina en el grupo de administración de anticuerpos de control, mientras que la elevación se suprimió significativamente en el grupo de administración de Anticuerpo A. Además, como se muestra en la Figura 4-2E, en el grupo al que se administró el anticuerpo policlonal anti-Myl9/12, aunque se observa la supresión de la elevación de la resistencia de las vías respiratorias dependiente de la concentración de metacolina, no se observó una diferencia significativa en el efecto del mismo. Se sugirió que el Anticuerpo A tiene un efecto antiinflamatorio de las vías respiratorias más potente que el anticuerpo policlonal anti-Myl9/12.

### **Ejemplo 3: Evaluación del efecto del fármaco del Anticuerpo A en el modelo de colitis ratón**

Powrie et al., Int. Immunol., 5, 1461-1471, 1993 se citó para la producción del modelo de enfermedad inflamatoria intestinal por transferencia de linfocitos T CD4-positivos CD45RB-fuerte positivos (CD4 + CD45RB<sup>high</sup>). Se resecó el bazo de ratones Balb/c hembra de 8 - 10 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.), y se trituró con vidrio esmerilado para separar las células del bazo. A las células de bazo separadas se añadieron 5 ml de agua destilada que contenía cloruro de amonio 155 mM, ácido carbónico hidrógeno potasio 10 mM, y EDTA-4Na 80 µM por bazo, y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos para lisar los eritrocitos. Se añadió dos veces el volumen de PBS a la disolución de células de bazo, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se recogió el precipitado. Los linfocitos T CD4 se purificaron de las células de bazo separadas mediante el kit de aislamiento de células T CD4 (de Miltenyi). Con el fin de separar los linfocitos T CD4-positivos CD45RB-fuerte positivos, los linfocitos T CD4 purificados se sometieron a tinción doble con anticuerpo anti-CD4 marcado con ficoeritrina (PE) (de eBioscience) y anticuerpo



anti-CD45RB marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (de eBioscience). Después de la doble tinción, las células CD4-positivas CD45RB-fuerte positivas se clasificaron con FACSria (de Becton, Dickinson and Company) para recoger las células de interés. Después de lavar las células recolectadas con PBS, se suspendieron en PBS a una concentración celular de  $2 \times 10^6$  células/ml. A la cavidad peritoneal de ratones hembra SCID de 8 semanas de edad (CLEA Japan, Inc.), se transfirieron 250  $\mu$ l cada uno, es decir,  $5 \times 10^5$  células/ratón de células CD4-positivas CD45RB-fuerte positivas preparadas como antes. A ocho animales por grupo de ratones SCID con células CD4-positivas CD45RB-fuerte positivas transferidas, se administraron 500  $\mu$ g del anticuerpo de control (IgG de ratón) y 500  $\mu$ g del Anticuerpo A (anticuerpo en disolución de PBS) dos veces por semana a partir del Día 11 después de la transferencia celular. Obsérvese que la administración se realizó desde la vena de la cola. Además, como grupo de control negativo, se transfirieron, a  $5 \times 10^5$  células/ratón, linfocitos T CD4 de ratón que se purificaron con el kit de aislamiento de células T CD4 (de Miltenyi) pero que no se separaron para la fuerza de expresión de CD45RB (células CD4-positivas completas). La autopsia se realizó 27 días después de la transferencia de células para puntuar y evaluar la pérdida de peso y la naturaleza de las heces en el intestino grueso. La puntuación de la naturaleza de las heces empleada en la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (Cooper y col., Lab. Invest., 69, 238-249, 1993) se utilizó para calificar la naturaleza de las heces.

Hubo una reducción significativa en el índice de actividad de la enfermedad (DAI) en el grupo de administración del Anticuerpo A en comparación con el grupo de administración del anticuerpo de control (Figura 5).

#### **Ejemplo 4: Producción de anticuerpos quiméricos y humanizados a partir del Anticuerpo A Preparación de anticuerpo quimérico y anticuerpo humanizado**

Primero, se construyó un vector de expresión para un anticuerpo quimérico. Como cadena pesada, la secuencia del gen que codifica la secuencia señal de la cadena pesada del Anticuerpo A (SEQ ID NO. 16) y la secuencia del gen que codifica la región variable (SEQ ID NO. 17) se insertaron en un vector de expresión (pcDNA3.4) que comprende la secuencia génica (SEQ ID NO. 45) que codifica la región constante de IgG2 humana que tiene las mutaciones V234A y G237A y la supresión del resto de lisina C-terminal (SEQ ID NO. 44), y como cadena ligera, la secuencia génica que codifica la secuencia señal de la cadena ligera del Anticuerpo A (SEQ ID NO. 18) y la secuencia del gen que codifica la región variable (SEQ ID NO. 19) se insertaron en un vector de expresión (pcDNA3.4) que comprende la secuencia génica (SEQ ID NO. 47) que codifica la región constante de Igk humana (SEQ ID NO. 46), construyendo así un vector de expresión para un anticuerpo quimérico. Para producir el anticuerpo quimérico, utilizando el sistema de expresión Expi293 (Gibco/ThermoFisher), dicho vector de expresión se transfectó en una célula Expi293F (Gibco/ThermoFisher). El sobrenadante se recogió y purificó con Proteína A (GE Healthcare). Aquí, "V234A" representa una mutación en la que la valina en la posición 234 se sustituye por alanina y "G237A" representa una mutación en la que la glicina en la posición 237 se sustituye por alanina.

Posteriormente, se diseñó la región variable del anticuerpo humanizado. Basado en la alta homología con la región marco (FR) del Anticuerpo A, la FR de un anticuerpo humano, IGKV2-28\*01 (SEQ ID NO.\* 48) o IGKV2-24\*01 (SEQ ID NO. 49) y JK4 (SEQ ID NO. 50) para la cadena ligera, e IGHV1-69\*02 (SEC ID NO.\*02 (SEQ ID NO. 51), IGHV1-46\*01 (SEQ ID NO. 52), o IGHV7-4-1\*02 (SEQ ID NO. 53) y JH4 (SEQ ID NO. 54) para la cadena pesada, se seleccionaron como FR del anticuerpo humanizado. Después, se empleó un modelo de predicción de estructura 3D del Anticuerpo A de ratón para predecir el aminoácido en la FR que interactúa con el aminoácido de CDR, y se injertó junto con CDR (SEQ ID NOs. 28 - 35). La región constante de IgG2 humana que posee las mutaciones V234A y G237A y que tiene la eliminación del resto de lisina C-terminal (SEQ ID NO. 44), y la región constante de Igk humana (SEQ ID NO. 46), se emplearon cada una como las regiones constantes de cadenas pesada y ligera. HK1-4 (SEQ ID NO. 55), HK1-5 (SEQ ID NO. 56), HK1-6 (SEQ ID NO. 57), HK1-A (SEQ ID NO. 58), HK2-5 (SEQ ID NO. 59), HK2-6 (SEQ ID NO. 60), HK2-9 (SEQ ID NO. 61), y HK3-2 (SEQ ID NO. 62) se diseñaron como regiones variables de cadena pesada del anticuerpo humanizado a cuya CDR determinada por el método de definición de Kabat (SEQ ID NOs. 28, 30 y 32) se injertaron, HA1-4 (SEQ ID NO. 63) y HA1-6\*01 (SEQ ID NO. 64) se diseñaron como regiones variables de cadena pesada del anticuerpo humanizado a cuya CDR determinada por el método de definición de AbM (SEQ ID NOs. 29, 31, 32) se injertaron, HK1-4, HK1-5, HK1-6, HK1-A, HA1-4 y HA1-6 se diseñaron como regiones variables de cadena pesada del anticuerpo humanizado que emplea IGHV1-69\*02 y JH4, HK2-5, HK2-6 y HK2-9 se diseñaron como regiones variables de cadena pesada del anticuerpo humanizado que emplea IGHV1-46\*01 y JH4, HK3-2 se diseñó como regiones variables de cadena pesada del anticuerpo humanizado que emplea IGHV7-4-1\*02 y JH4, L1-4 (SEQ ID NO. 65), L1-5 (SEQ ID NO. 66), y L1-A (SEQ ID NO. 67) se diseñaron como regiones variables de cadena ligera del anticuerpo humanizado que emplea IGKV2-28\*01 y JK4, y L4-2 (SEQ ID NO.\* 68) se diseñó como regiones variables de cadena ligera del anticuerpo humanizado que emplea IGKV2-24\*01 y JK4.\*

Las secuencias génicas que codifican las secuencias de aminoácidos de HK1-4, HK1-5 y HK1-6 se produjeron diseñando una secuencia de aminoácidos en la que las CDR de cadena pesada del Anticuerpo A (SEQ ID NOs. 28, 30 y 32) se injertaron en IGHV1-69\*02 (SEQ ID NO. IGHV1-69\* 51) y JH4 (SEQ ID NO. 54) y la secuencia señal (SEQ ID NO. 69) se añadió en el extremo N, convirtiendo la secuencia de aminoácidos diseñada en una secuencia génica, y sintetizando la secuencia génica mediante GenScript USA Inc., e introduciendo mutaciones mediante PCR (HK1-4: SEQ ID NO. 70, HK1-5: SEQ ID NO. 71, HK1-6: SEQ ID NO. 72, secuencia señal: SEQ ID NO. 73). La secuencia génica que codifica la secuencia de aminoácidos de HK1-A se convirtió a partir de una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia señal (SEQ ID NO. 69) añadida en el extremo N de HK1-A y sintetizada mediante GenScript USA

Inc. (HK1-A: SEQ ID NO. 74, secuencia señal: SEQ ID NO. 75). Las secuencias génicas que codifican las secuencias de aminoácidos de HK2-5, HK2-6 y HK2-9 se produjeron diseñando una secuencia de aminoácidos en la que las CDR de cadena pesada del Anticuerpo A (SEQ ID NOs. 28, 30 y 32) se injertaron en IGHV1-46\*01 (SEQ ID NO. 52) y JH4 (SEQ ID NO. 54) y la secuencia señal (SEQ ID NO. 69) se añadió en el extremo N, convirtiendo la secuencia de aminoácidos diseñada en una secuencia génica, y sintetizando la secuencia génica mediante GenScript USA Inc., e introduciendo mutaciones mediante PCR (HK2-5: SEQ ID NO. 76, HK2-6: SEQ ID NO. 77, HK2-9: SEQ ID NO. 78, secuencia señal: SEQ ID NO. 79). La secuencia génica que codifica la secuencia de aminoácidos de HK3-2 se sintetizó convirtiendo una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia señal (SEQ ID NO. 69) añadida en el extremo N de HK3-2 en una secuencia génica mediante GenScript USA Inc. (HK3-2: SEQ ID NO. 80, secuencia señal: SEQ ID NO. 81). Las secuencias génicas que codifican las secuencias de aminoácidos HA1-4 y HA1-6 se produjeron diseñando una secuencia de aminoácidos en la que las CDR de cadena pesada del Anticuerpo A (SEQ ID NOs. 29, 31, y 32) en IGHV1-69\*02 (SEQ ID NO. 51) y JH4 (SEQ ID NO. 54) y la secuencia señal (SEQ ID NO. 69) se añadió en el extremo N, convirtiéndose en una secuencia génica, y sintetizando la secuencia génica mediante GenScript USA Inc., e introduciendo mutaciones mediante PCR (HA1-4: SEQ ID NO. 82, HA1-6: SEQ ID NO. 83, secuencia señal: SEQ ID NO. 84). Las secuencias génicas que codifican las secuencias de aminoácidos de L1-4 y L1-5 se produjeron diseñando una secuencia de aminoácidos en la que las CDR de cadena ligera del Anticuerpo A (SEQ ID NOs. 33 - 35) en IGKV2-28\*01 (SEQ ID NO. 48) y JK4 (SEQ ID NO. 50) y la secuencia señal (SEQ ID NO. 85) se añadió en el extremo N, convirtiéndose en una secuencia génica, y sintetizando la secuencia génica mediante GenScript USA Inc., e introduciendo mutaciones mediante PCR (L1-4: SEQ ID NO. 86, L1-5: SEQ ID NO. 87, secuencia señal: SEQ ID NO. 88). Las secuencias génicas que codifican las secuencias de aminoácidos de L1-A y L4-2 se sintetizaron convirtiendo las secuencias de aminoácidos que tienen la secuencia señal (SEQ ID NO. 85) añadida en el extremo N de L1-A y L4-2 en secuencias génicas mediante GenScript USA Inc. (L1-A: SEQ ID NO. 89, secuencia señal de L1-A: SEQ ID NO. 90, L4-2: SEQ ID NO. 91, secuencia señal de L4-2: SEQ ID NO. 92). Los genes que codifican estas regiones variables de cadena pesada humanizadas y secuencias señal se insertaron en un vector de expresión (pcDNA3.4) que comprende una secuencia génica (SEQ ID NO. 45) que codifica la región constante de IgG2 humana que posee las mutaciones V234A y G237A y que tiene la supresión del resto de lisina C-terminal (SEQ ID NO. 44). Los genes que codifican estas regiones variables de cadena ligera humanizadas y secuencias señal se insertaron en un vector de expresión (pcDNA3.4) que comprende una secuencia génica (SEQ ID NO. 47) que codifica la región constante de Igk humana (SEQ ID NO. 46). Aquí, "V234A" representa una mutación en la que la valina en la posición 234 se sustituye por alanina y "G237A" representa una mutación en la que la glicina en la posición 237 se sustituye por alanina. Para producir el anticuerpo, utilizando el sistema de expresión Expi293 (Gibco/ThermoFisher), dicho vector de expresión se transfectó en células Expi293F (Gibco/ThermoFisher) en las combinaciones que se muestran en la Tabla 1. El sobrenadante se recogió y purificó con Proteína A (GE Healthcare).

[Tabla 1]

Anticuerpo humanizado No.	Cadena H			Cadena L		
	Región variable			Región variable		
	Nombre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.)	Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO.)	Nombre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.)	Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO.)
110	HA1-6	64	83	L1-5	66	87
111	HA1-4	63	82	L1-5	66	87
112	HK1-5	56	71	L1-5	66	87
113	HK1-6	57	72	L1-5	66	87
114	HK1-4	55	70	L1-5	66	87
115	HK1-A	58	74	L1-5	66	87
116	HK2-5	59	76	L1-5	66	87
117	HK2-6	60	77	L1-5	66	87
118	HK2-9	61	78	L1-5	66	87
121	HA1-6	64	83	L4-2	68	91
122	HA1-4	63	82	L4-2	68	91
123	HK1-5	56	71	L4-2	68	91
124	HK1-6	57	72	L4-2	68	91
125	HK1-4	55	70	L4-2	68	91

Anticuerpo humanizado No.	Cadena H			Cadena L		
	Región variable			Región variable		
	Nombre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.)	Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO.)	Nombre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.)	Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO.)
126	HK1-A	58	74	L4-2	68	91
127	HK2-5	59	76	L4-2	68	91
128	HK2-6	60	77	L4-2	68	91
129	HK2-9	61	78	L4-2	68	91
131	HK3-2	62	80	L1-4	65	86
132	HK3-2	62	80	L1-A	67	89
133	HK3-2	62	80	L1-5	66	87
134	HK3-2	62	80	L4-2	68	91

#### **Análisis de la capacidad de unión de anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A contra la proteína Myl9 humana**

5 La capacidad de unión de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A contra Myl9 humana se evaluó mediante ELISA. Las proteínas Myl3 humana-His y Myl9 humana-His se prepararon mediante métodos descritos en el Ejemplo 1.

10 La capacidad de unión contra Myl9 humana se evaluó siguiendo las etapas a continuación mediante ELISA. Myl3 humana-His y Myl9 humana-His se revistieron sobre los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20 al 0,02%/PBS, se realizaron siete diluciones en serie de seis veces de los anticuerpos chiméricos y humanizados a partir de una concentración de 10 µg/ml, y se añadieron a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces, se añadió anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

Todos los anticuerpos humanizados de la Tabla 1 se unieron en función de la concentración a Myl9 humana en la misma medida que el anticuerpo quimérico, y no se unieron a Myl3 humana (Figuras 6-1 a 6-3).

#### **Ejemplo 5: Capacidad de unión del Anticuerpo A y el anticuerpo quimérico y humanizado del mismo contra las proteínas Myl12a y 12b de ratón/humana**

##### **Preparación de proteínas Myl12a y Myl12b de ratón/humana**

30 Siguiendo las etapas a continuación, se produjeron las proteínas que tienen una etiqueta de histidina unida al extremo C de cada una de Myl12a de ratón (No. de acceso de Genbank NP\_080340.2, SEQ ID NO. 93), Myl12b de ratón (No. de acceso de Genbank NP\_075891.1, SEQ ID NO. 94), Myl12a humana (No. de acceso de Genbank NP\_001289976.1, SEQ ID NO. 95) y Myl12b humana (No. de acceso de Genbank No.NP\_001138416.1 SEQ ID NO. 96) (en lo sucesivo denominadas respectivamente Myl12a de ratón-His, Myl12b de ratón-His, Myl12a humana-His, y Myl12b humana-His). Se muestra la comparación de secuencias de aminoácidos entre Myl9, Myl12a y Myl12b de ratón (Figura 7A), así como Myl9, Myl12a y Myl12b humanas (Figura 7B).

Los genes que codifican las proteínas Myl12a y Myl12b de ratón se donaron por la Universidad de Chiba. Los genes que codifican las proteínas Myl12a y Myl12b humanas se amplificaron mediante PCR a partir de ADNc de corazón o intestino delgado humano. Estos genes se insertaron en el sitio BglII/BamHI de un vector pET42b (Merck) que tenía insertado el gen que codifica la secuencia de escisión de PreScission Protease (GE Healthcare). El vector producido se transformó en la cepa de E. coli BL21-Gold (DE3) pLys (Agilent Technologies) para permitir la expresión de Myl12a-His de ratón, Myl12b-His de ratón, Myl12a-His humano, y Myl12b-His humano con una etiqueta GST adjunta. Las proteínas expresadas se purificaron con Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare), la etiqueta GST se cortó con PreScission Protease, y Myl12a de ratón-His, Myl12b de ratón-His, Myl12a humana-His, y Myl12b humana-His se purificaron con TALON Superflow Metal Affinity Resin (CLONTECH).

A Myl12a de ratón-His, Myl12b de ratón-His, Myl12a humana-His, Myl12b humana-His, o Myl3 de ratón-His, Myl9 de ratón-His, Myl3 humana-His, Myl9 humana-His, purificadas en el Ejemplo 1, se añadió ditiotritol (Wako) a la concentración final de 50 mM, y la incubación se realizó a 4°C durante una hora para obtener los monómeros. La diálisis se realizó con PBS después de la incubación.

#### **Análisis de la capacidad de unión del Anticuerpo A contra las proteínas Myl12a y Myl12b de ratón/humanas**

La capacidad de unión del Anticuerpo A contra Myl12a y Myl12b de ratón/humanas se evaluó siguiendo las etapas a continuación mediante ELISA. Myl3 de ratón-His, Myl9 de ratón-His, Myl12a de ratón-His, Myl12b de ratón-His, Myl3 humana-His, Myl9 humana-His, Myl12a humana-His, y Myl12b humana-His se recubieron en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20 al 0,02%/PBS, se realizaron once diluciones en serie de cuatro veces del Anticuerpo A a partir de una concentración de 10 µg/ml, y se añadieron a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces, se añadió anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (Thermo Scientific).

El anticuerpo A mostró una unión dependiente de la concentración a Myl12a y Myl12b, que tienen una alta homología con Myl9 humana y de ratón, pero no se unió a Myl3 humana y de ratón, que tienen una homología baja con Myl9 humana y de ratón (Figuras 8A y B).

#### **Análisis de la capacidad de unión de anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A contra las proteínas Myl12a y Myl12b humanas**

La capacidad de unión de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A contra Myl12a Myl12b humanas se evaluó siguiendo las etapas a continuación mediante ELISA. Myl3 humana-His, Myl9 humana-His, Myl12a humana-His y Myl12b humana-His se revistieron sobre los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc), respectivamente. Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20 al 0,02%/PBS, los anticuerpos quiméricos y humanizados se diluyeron a la concentración de 0,01, 0,1 y 1 µg/ml, respectivamente, y se añadieron a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces, se añadió anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (Thermo Scientific).

Los anticuerpos quiméricos y humanizados mostraron unión dependiente de la concentración a Myl12a y Myl12b, que tienen una alta homología con Myl9 humana, pero no se unieron a Myl3 humana, que tiene una baja homología con Myl9 humana (Figuras 9-A a 9-C).

#### **Ejemplo 6: Efecto inhibitor del Anticuerpo A y sus anticuerpos quiméricos y humanizados frente a la actividad de unión entre Myl9 humana, Myl12a humana y Myl12b humana y la proteína de la región extracelular CD69 humana**

#### **Unión entre las proteínas Myl9, Myl12a y Myl12b humanas y la proteína de la región extracelular CD69 humana**

La unión de las proteínas Myl9, Myl12a y Myl12b humanas y la proteína de la región extracelular CD69 humana se evaluó mediante ELISA. Se produjo una proteína que tenía una etiqueta Flag añadida al extremo N de la región extracelular (posiciones 64-199, SEQ ID NO. 97) de proteína CD69 humana (a continuación, proteína 3 x Flag-CD69 EC humana) siguiendo las etapas a continuación. Se muestra la comparación de secuencias de aminoácidos entre proteína CD69 humana y de ratón, región extracelular (Figura 10).

La Universidad de Chiba proporcionó un plásmido de expresión que comprende un gen que codifica la proteína 3 x Flag-CD69 EC humana, y se transfeció en células Expi293F (Invitrogen/LifeTechnologies) con el kit de transfección ExpiFectamine 293 (Thermo Fisher Scientific/Gibco). Después de 4 días de incubación (8% de CO<sub>2</sub>, 37 °C), se recolectó el sobrenadante del cultivo. A partir del sobrenadante del cultivo recogido, se purificó proteína 3 x Flag-CD69 EC humana con gel de afinidad Anti-Flag M2 (SIGMA). Después de la purificación, la proteína dimerizada se recogió usando Superdex200 o Superdex75.

La evaluación de la unión entre Myl9, Myl12a y Myl12b humanas y la proteína de la región extracelular CD69 humana se llevó a cabo mediante ELISA. Myl3 humana-His, Myl9 humana-His, Myl12a humana-His y Myl12b humana-His,

preparadas en el Ejemplo 5, se revistieron sobre los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc), respectivamente. Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20 al 0,02%/PBS, se realizaron seis diluciones en serie de tres veces de proteína 3 x Flag-CD69 EC humana a partir de una concentración de 10 µg/ml mediante NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/ 0,02% de Tween 20, y se añadieron a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y media y lavar tres veces con NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, se añadió el anticuerpo anti-Flag (M2) marcado con peroxidasa de rábano picante (SIGMA), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (Thermo Scientific).

La proteína de la región extracelular CD69 humana mostró unión dependiente de la concentración a Myl9, Myl12a y Myl12b humanas, que tienen una alta homología con Myl9 humana, pero no se unieron a Myl3 humana, que tiene una baja homología con Myl9 humana (Figura 11).

#### **Evaluación de la actividad inhibidora del Anticuerpo A contra la actividad de unión de Myl9 humana, Myl12a humana y Myl12b humana, y proteína de la región extracelular CD69 humana**

La evaluación de la actividad inhibidora del Anticuerpo A frente a la unión entre Myl9 humana, Myl12a humana y Myl12b humana, y la proteína de la región extracelular CD69 humana se llevó a cabo según las siguientes etapas mediante ELISA. Myl9 humana-His, Myl12a humana-His y Myl12b humana-His, preparadas en el Ejemplo 5, se revistieron sobre los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc), respectivamente. Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20 al 0,02%/PBS, se realizaron siete diluciones en serie de tres veces el Anticuerpo A o el anticuerpo de control (anticuerpo anti-dinitrofenol, IgG2c, κ de ratón) a partir de una concentración de 30 µg/ml con NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, y se añadieron a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces, la proteína 3 x Flag-CD69 EC humana se diluyó a una concentración de 10 µg/ml con NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, y se añadió a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y media y lavar tres veces con NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, se añadió el anticuerpo anti-Flag (M2) marcado con peroxidasa de rábano picante (SIGMA), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (Thermo Scientific).

El anticuerpo A mostró una inhibición dependiente de la concentración contra la unión entre Myl9 humana, Myl12a humana y Myl12b humana, y la proteína de la región extracelular CD69 humana (Figura 12). El anticuerpo de control no mostró actividad inhibidora. El fondo de la figura indica la coloración entre proteína 3 x Flag-CD69 EC humana y anticuerpo anti-Flag (M2) marcado con peroxidasa de rábano picante (SIGMA) en un pocillo en el que Myl9 humana-His, Myl12a humana-His o Myl12b humana-His no están inmovilizadas.

#### **Evaluación de la actividad inhibidora de anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A frente a la actividad de unión de la proteína de la región extracelular humana CD69 y Myl9 humana**

La evaluación de la actividad inhibidora de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A frente a la unión entre Myl9 humana y la proteína de la región extracelular CD69 humana se llevó a cabo según las siguientes etapas mediante ELISA. Myl9 humana-His, preparada en el Ejemplo 5, se revistieron sobre los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20/PBS al 0,02%, se realizaron siete diluciones en serie de tres veces de Anticuerpo A, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpo de control (IgG2 humana, κ, Sigma), a partir de una concentración de 30 µg/ml mediante NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, y se añadieron a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces, la proteína 3 x Flag-CD69 EC humana se diluyó a una concentración de 10 µg/ml con NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, y se añadió a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces con NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, se añadió el anticuerpo anti-Flag (M2) marcado con peroxidasa de rábano picante (SIGMA), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (Thermo Scientific).

Los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A mostraron una inhibición dependiente de la concentración contra la unión entre Myl9 humana y la proteína de la región extracelular CD69 humana (Figuras 13-1 a 13-5). El anticuerpo de control no mostró actividad inhibidora. El fondo de la figura indica la coloración entre

proteína 3 x Flag-CD69 EC humana y anticuerpo anti-Flag (M2) marcado con peroxidasa de rábano picante (SIGMA) en un pocillo en el que Myl9 humana-His no está inmovilizada.

**Evaluación de la actividad inhibidora de anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A frente a la actividad de unión de Myl12a humana y Myl12b humana y la proteína de la región extracelular CD69 humana**

La evaluación de la actividad inhibidora de los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A frente a la unión entre Myl12a humana y Myl12b humana y la proteína de la región extracelular CD69 humana se llevó a cabo según las siguientes etapas mediante ELISA. Myl12a-His y Myl12b-His humanas, preparadas en el Ejemplo 5, se revistieron sobre los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc), respectivamente. Después de una incubación durante la noche a 4°C, los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Después de lavar tres veces con Tween 20 al 0,02%/PBS, el anticuerpo A, el anticuerpo quimérico, los anticuerpos humanizados, o el anticuerpo de control (IgG2 humana,  $\kappa$ , Sigma) se diluyeron a concentraciones de 0,1, 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  con NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, y se añadieron a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y lavar tres veces, la proteína 3 x Flag-CD69 EC humana se diluyó a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  con NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, y se añadió a los pocillos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y media y lavar tres veces con NaOAc 50 mM (pH 5,5)/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,02%, se añadió el anticuerpo anti-Flag (M2) marcado con peroxidasa de rábano picante (SIGMA), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar 5 veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a los pocillos, y se incubaron durante 5 - 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a los pocillos una cantidad igual de disolución de extinción de la reacción ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N), y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (Thermo Scientific).

Los anticuerpos quiméricos y humanizados preparados a partir del Anticuerpo A mostraron una inhibición dependiente de la concentración contra la unión entre Myl12a y Myl12b humanas y la proteína de la región extracelular CD69 humana (Figuras 14-1 a 14-4). El anticuerpo de control no mostró actividad inhibidora. El fondo de la figura significa la coloración entre proteína 3 x Flag-CD69 EC humana y anticuerpo anti-Flag (M2) marcado con peroxidasa de rábano picante (SIGMA) en un pocillo en el que Myl12a humana-His o Myl12b humana-His no están inmovilizadas.

**Ejemplo 7: Efecto antitumoral de la administración combinada de Anticuerpo A y anticuerpo anti-PD-1**

La línea celular de cáncer colorrectal de ratón CT26.WT (ATCC No. CRT-2638), cultivada en medio de cultivo RPMI1640 que contenía FBS al 10% y penicilina/estreptomina, se suspendió en una disolución salina amortiguada con fosfato para obtener una suspensión celular de una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml. La suspensión celular se trasplantó por vía subcutánea en la región posterior derecha de ratones de 6 semanas de edad (BALB/c, hembra, Charles River Laboratories Japan, Inc.) a una dosis de 0,1 ml. Seis días después del trasplante, se midió el diámetro mayor y el eje corto del tumor con un calibrador digital electrónico (Digimatic (TM) Caliper, Mitutoyo Corporation). El volumen del tumor se calculó mediante la siguiente fórmula de cálculo.

Volumen del tumor ( $\text{mm}^3$ ) = diámetro más largo (mm) x eje corto (mm) x eje corto (mm)/2

La Figura 15 muestra los resultados del análisis de la expresión génica del tejido tumoral subcutáneo de la línea celular de cáncer colorrectal de ratón CT26.WT. El ácido nucleico se extrajo del tejido tumoral derivado de CT26.WT con el reactivo TRIzol (marca registrada) (Thermo Fisher Scientific), y el ARN total se preparó con el kit Mini Rneasy (Qiagen). A partir del ARN total, se preparó una biblioteca con el kit de preparación de bibliotecas de ARN específico de cadena SureSelect (Agilent Technologies) para el análisis de RNASeq, y la secuenciación se realizó con HiSeq4000 (illumine). Los archivos Fastq obtenidos por la secuenciación se normalizaron por el método TPM (Transcript Por Millón), y se midió la expresión de Myl9, Myl12a y Myl12b. La expresión de Myl9 fue baja, y las expresiones de Myl12a y Myl12b fueron altas en el tejido tumoral.

Los ratones se dividieron en grupos de modo que el valor promedio del volumen tumoral de cada grupo fuera casi igual en base al volumen tumoral del primer día de la administración. El Anticuerpo A y el anticuerpo anti-PD-1 (BoXCell, Catálogo #: BE0146) se prepararon en una disolución de 2 mg/ml con disolución salina amortiguada con fosfato, y se administraron por vía intraperitoneal a ratones a una dosis de 0,1 ml/ratón dos veces durante siete días, cuatro veces en total (Días 6, 9, 13 y 16 después del trasplante de células cancerosas). En el grupo de control, se administró una disolución salina amortiguada con fosfato por vía intraperitoneal a ratones a una dosis de 0,2 ml/ratón dos veces cada siete días, cuatro veces en total (Días 6, 9, 13 y 16 después del trasplante de células cancerosas). Cada grupo tenía 7-8 ratones.

La Figura 16 muestra los cambios con el paso de los días de los volúmenes tumorales calculados en el grupo de control (A), grupo de administración de Anticuerpo A (B), grupo de administración de anticuerpo anti-PD-1 (C), y combinación de grupo de administración de Anticuerpo A y anticuerpo anti-PD-1 (D) hasta los últimos días del ensayo (Día 30). Como se muestra en la Figura 16B,

El Anticuerpo A solo casi no inhibía el crecimiento del tumor. El anticuerpo anti-PD-1 solo inhibía ligeramente el crecimiento del tumor en comparación con el grupo de control (Figura 16C). La administración combinada de Anticuerpo A y anticuerpo anti-PD-1 inhibió significativamente el crecimiento del tumor, y se confirmó la desaparición del tumor en ratones (2/10) (Figura 16D). Los resultados anteriores sugieren un efecto sinérgico por la administración combinada del Anticuerpo A y el anticuerpo anti-PD-1.

#### Aplicabilidad Industrial

Se puede proporcionar un anticuerpo anti-Myl9 o un fragmento de unión a Myl9 del mismo que se une a Myl9 y puede inhibir la interacción entre Myl9 y CD69, así como una composición farmacéutica que comprende el mismo. El anticuerpo o la composición farmacéutica según la presente invención pueden ser útiles para tratar una enfermedad atribuida a la interacción entre Myl9 y CD69, por ejemplo inflamación alérgica de las vías respiratorias tales como asma, rinitis alérgica crónica, o alguna sinusitis, enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias tales como sinusitis no incluida en la inflamación alérgica de las vías respiratorias, y enfermedad inflamatoria intestinal tal como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad de Behcet, y disfunción gastrointestinal eosinofílica. El anticuerpo según la presente invención también puede inhibir la interacción entre Myl12 y CD69. Por consiguiente, el anticuerpo o la composición farmacéutica según la presente invención pueden ser útiles para tratar una enfermedad asociada con la interacción entre Myl9 y/o Myl12 y CD69, por ejemplo tumores tales como cáncer colorrectal, melanoma maligno, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales, linfoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de pulmón microcítico, mesotelioma, y cáncer de endometrio, cuando se combina con un inhibidor del punto de control inmunitario. Las realizaciones a las que se hace referencia bajo "descripción" no forman parte de la invención.

#### LISTA DE SECUENCIAS

<110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. CHIBA UNIVERSITY

<120> Anticuerpo anti-myl9

<130> ESAP1508F

<150> JP2016-003429

<151> 2016-01-12

<160> 97

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

<213> Mus musculus

# ES 2 913 162 T3

<400> 1

```

Met Ser Ser Lys Arg Ala Lys Ala Lys Thr Thr Lys Lys Arg Pro Gln
1          5          10          15

Arg Ala Thr Ser Asn Val Phe Ala Met Phe Asp Gln Ser Gln Ile Gln
          20          25          30

Glu Phe Lys Glu Ala Phe Asn Met Ile Asp Gln Asn Arg Asp Gly Phe
          35          40          45

Ile Asp Lys Glu Asp Leu His Asp Met Leu Ala Ser Leu Gly Lys Asn
50          55          60

Pro Thr Asp Glu Tyr Leu Glu Gly Met Met Asn Glu Ala Pro Gly Pro
65          70          75          80

Ile Asn Phe Thr Met Phe Leu Thr Met Phe Gly Glu Lys Leu Asn Gly
          85          90          95

Thr Asp Pro Glu Asp Val Ile Arg Asn Ala Phe Ala Cys Phe Asp Glu
          100          105          110

Glu Ala Ser Gly Phe Ile His Glu Asp His Leu Arg Glu Leu Leu Thr
          115          120          125

Thr Met Gly Asp Arg Phe Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Tyr Arg
          130          135          140

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

      Arg Ile Leu Lys His Gly Ala Lys Asp Lys Asp Asp
          165          170

```

5

<210> 2  
 <211> 172  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 2



# ES 2 913 162 T3

```

Met Ser Ser Lys Arg Ala Lys Ala Lys Thr Thr Lys Lys Arg Pro Gln
1          5          10          15

Arg Ala Thr Ser Asn Val Phe Ala Met Phe Asp Gln Ser Gln Ile Gln
          20          25          30

Glu Phe Lys Glu Ala Phe Asn Met Ile Asp Gln Asn Arg Asp Gly Phe
          35          40          45

Ile Asp Lys Glu Asp Leu His Asp Met Leu Ala Ser Leu Gly Lys Asn
          50          55          60

Pro Thr Asp Glu Tyr Leu Glu Gly Met Met Ser Glu Ala Pro Gly Pro
65          70          75          80

Ile Asn Phe Thr Met Phe Leu Thr Met Phe Gly Glu Lys Leu Asn Gly
          85          90          95

Thr Asp Pro Glu Asp Val Ile Arg Asn Ala Phe Ala Cys Phe Asp Glu
          100          105          110

Glu Ala Ser Gly Phe Ile His Glu Asp His Leu Arg Glu Leu Leu Thr
          115          120          125

Thr Met Gly Asp Arg Phe Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Tyr Arg
          130          135          140

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

Arg Ile Leu Lys His Gly Ala Lys Asp Lys Asp Asp
          165          170

```

<210> 3  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Ser Ser Lys Arg Ala Lys Ala Lys Thr Thr Lys Lys Arg Pro Gln
          1          5          10          15

```

```

Arg Ala Thr Ser Asn Val Phe Ala Met Phe Asp Cys
          20          25

```

<210> 4  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 4

# ES 2 913 162 T3

Asn Val Gly Lys Tyr Asn Cys Pro Gly Leu Tyr Glu Lys Leu Glu Ser  
1 5 10 15

Ser Asp His His Val Ala Thr Cys Lys Asn Glu Trp Ile Ser Tyr Lys  
20 25 30

Arg Thr Cys Tyr Phe Phe Ser Thr Thr Thr Lys Ser Trp Ala Leu Ala  
35 40 45

Gln Arg Ser Cys Ser Glu Asp Ala Ala Thr Leu Ala Val Ile Asp Ser  
50 55 60

Glu Lys Asp Met Thr Phe Leu Lys Arg Tyr Ser Gly Glu Leu Glu His  
65 70 75 80

Trp Ile Gly Leu Lys Asn Glu Ala Asn Gln Thr Trp Lys Trp Ala Asn  
85 90 95

Gly Lys Glu Phe Asn Ser Trp Phe Asn Leu Thr Gly Ser Gly Arg Cys  
100 105 110

Val Ser Val Asn His Lys Asn Val Thr Ala Val Asp Cys Glu Ala Asn  
115 120 125

Phe His Trp Val Cys Ser Lys Pro Ser Arg  
130 135

<210> 5

<211> 204

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Ala Pro Lys Lys Pro Glu Pro Lys Lys Asp Asp Ala Lys Ala Ala  
1 5 10 15

Ala Pro Lys Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro  
20 25 30

# ES 2 913 162 T3

Ala Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Pro Lys Glu Ala Glu Phe Asp Ala  
35 40 45

Ser Lys Ile Lys Ile Glu Phe Thr Pro Glu Gln Ile Glu Glu Phe Lys  
50 55 60

Glu Ala Phe Leu Leu Phe Asp Arg Thr Pro Lys Gly Glu Met Lys Ile  
65 70 75 80

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

Thr Gln Ala Glu Val Leu Arg Val Leu Gly Lys Pro Lys Gln Glu Glu  
100 105 110

Leu Asn Ser Lys Met Met Asp Phe Glu Thr Phe Leu Pro Met Leu Gln  
115 120 125

His Ile Ser Lys Asn Lys Asp Thr Gly Thr Tyr Glu Asp Phe Val Glu  
130 135 140

Gly Leu Arg Val Phe Asp Lys Glu Gly Asn Gly Thr Val Met Gly Ala  
145 150 155 160

Glu Leu Arg His Val Leu Ala Thr Leu Gly Glu Arg Leu Thr Glu Asp  
165 170 175

Glu Val Glu Lys Leu Met Ala Gly Gln Glu Asp Ser Asn Gly Cys Ile  
180 185 190

Asn Tyr Glu Ala Phe Val Lys His Ile Met Ala Ser  
195 200

<210> 6

<211> 195

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Pro Lys Lys Pro Glu Pro Lys Lys Asp Asp Ala Lys Ala Ala  
1 5 10 15

Pro Lys Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Glu Pro Glu Arg Pro  
20 25 30

Lys Glu Val Glu Phe Asp Ala Ser Lys Ile Lys Ile Glu Phe Thr Pro  
35 40 45

# ES 2 913 162 T3

Glu Gln Ile Glu Glu Phe Lys Glu Ala Phe Met Leu Phe Asp Arg Thr  
 50 55 60  
 Pro Lys Cys Glu Met Lys Ile Thr Tyr Gly Gln Cys Gly Asp Val Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Ala Leu Gly Gln Asn Pro Thr Gln Ala Glu Val Leu Arg Val Leu  
 85 90 95  
 Gly Lys Pro Arg Gln Glu Glu Leu Asn Thr Lys Met Met Asp Phe Glu  
 100 105 110  
 Thr Phe Leu Pro Met Leu Gln His Ile Ser Lys Asn Lys Asp Thr Gly  
 115 120 125  
 Thr Tyr Glu Asp Phe Val Glu Gly Leu Arg Val Phe Asp Lys Glu Gly  
 130 135 140  
 Asn Gly Thr Val Met Gly Ala Glu Leu Arg His Val Leu Ala Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Arg Leu Thr Glu Asp Glu Val Glu Lys Leu Met Ala Gly Gln  
 165 170 175  
 Glu Asp Ser Asn Gly Cys Ile Asn Tyr Glu Ala Phe Val Lys His Ile  
 180 185 190  
 Met Ser Ser  
 195

- 5 <210> 7  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 10 <400> 7  
 acatcactcc gt 12  
  
 15 <210> 8  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 25 <400> 8  
 acggagtgat gtccgtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct 50  
  
 30 <210> 9  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 30 <400> 9  
 agctacgctg aagtatcaac gcagag 26

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 10  
 10 gccagtggat agactgatgg 20  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 20 <400> 11  
 gatggataca gttggtgcag c 21  
 <210> 12  
 <211> 19  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30 <400> 12  
 Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Ile Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Ser  
 <210> 13  
 35 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 13

# ES 2 913 162 T3

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

<210> 14

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 14

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

Ser Ser Ser

15

<210> 15

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 15

# ES 2 913 162 T3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Arg Ser  
35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
100 105 110

Lys

<210> 16  
<211> 57  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Polinucleótido sintético

<400> 16  
atggaatgga gctgggtctt tctctcctc ctgtcagtaa ttgcaggtgt ccaatcc 57

<210> 17  
15 <211> 351  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Polinucleótido sintético

<400> 17

caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag gtggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg	60
tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca	120
cctgtgcatg gcctggaatg gattggagct attgatcctg aaactggtgg tactgcctac	180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac	240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac agactatgat	300
tacgacgggt ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc a	351

<210> 18  
30 <211> 57  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético  
 <400> 18  
 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagt 57

5 <210> 19  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 19  
 gatggttgga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca ggccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120  
 tacctgcaga agccaggccg gtctccaaag ctctgatct ccaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240  
 accagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaaatac acatgttcct 300  
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

15 <210> 20  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador sintético

<400> 20  
 25 gcgaagcttg ccgccacat ggaatggagc tgggtcttc 40

<210> 21



5      <211> 39  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador sintético  
 10     <400> 21  
       gcgaagcttg ccgccacat gaagttgcct gtaggctg 39  
       <210> 22  
       <211> 36  
       <212> ADN  
 15     <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador sintético  
 20     <400> 22  
       gcggaattca tcattaccc agagaccggg agatgg 36  
       <210> 23  
       <211> 40  
 25     <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador sintético  
 30     <400> 23  
       gcggaattca ctaacactca ttctgttga agctcttgac 40  
       <210> 24  
 35     <211> 335  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
 40     <223> Polipéptido sintético  
       <400> 24

# ES 2 913 162 T3

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

# ES 2 913 162 T3

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser  
 130 135 140  
 Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp  
 145 150 155 160  
 Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln  
 165 170 175  
 Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser  
 180 185 190  
 Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys  
 195 200 205  
 Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 210 215 220  
 Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu Thr Cys Met  
 245 250 255  
 Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp Thr Ser Asn  
 260 265 270  
 Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser  
 275 280 285  
 Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln Lys Ser Thr  
 290 295 300  
 Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu  
 305 310 315 320  
 His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys  
 325 330 335

<210> 25

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 25

# ES 2 913 162 T3

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
35 40 45

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

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
100 105

<210> 26

<211> 1008

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

10 <400> 26

# ES 2 913 162 T3

	gccaaaacaa cagccccatc ggtctatcca ctggcccctg tgtgtggagg tacaactggc	60
	tcctcgggtga ctctaggatg cctggtcaag ggttatttcc ctgagccagt gaccttgacc	120
	tggaactctg gatccctgtc cagtgggtgtg cacaccttcc cagctctcct gcagtctggc	180
	ctctacaccc tcagcagctc agtgactgta acctogaaca cctggcccag ccagaccatc	240
	acctgcaatg tggcccaccc ggcaagcagc accaaagtgg acaagaaaat tgagcccaga	300
	gtgcccataa cacagaaccc ctgtcctcca ctcaaagagt gtcccccatg cgcagctcca	360
	gacctcttggt gtggaccatc cgtcttcac cttccctccaa agatcaagga tgtactcatg	420
	atctccctga gcccctggt cacatgtgtg gtggtggatg tgagcgagga tgaccagac	480
	gtccagatca gctggtttgt gaacaacgtg gaagtacaca cagctcagac acaaaccat	540
	agagaggatt acaacagtac tctccgggtg gtcaagtgcc tccccatcca gcaccaggac	600
	tgatgagtg gcaaggagtt caaatgcaag gtcaacaaca gagccctccc atcccccatc	660
	gagaaaacca tctcaaaacc cagagggcca gtaagagctc cacaggtata tgtcttgctt	720
	ccaccagcag aagagatgac taagaaagag ttcagtctga cctgcatgat cacaggcttc	780
	ttacctgccg aaattgctgt ggactggacc agcaatgggc gtacagagca aaactacaag	840
	aacaccgcaa cagtcctgga ctctgatggt tcctacttca tgtacagcaa gctcagagta	900
	caaaagagca cttgggaaag aggaagtctt ttcgctgct cagtgggtcca cgagggtctg	960
5	cacaatcacc ttacgactaa gaccatctcc cgtctctggt gtaaatga	1008
	<210> 27	
	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 27	
15	cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc ttcccacccat ccagtgagca gttaacatct	60
	ggagggtgcct cagtcgtgtg cttcttgaac aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag	120
	tggaagattg atggcagtga acgacaaaat ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac	180
	agcaaagaca gcacctacag catgagcagc accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa	240
	cgacataaca gctatacctg tgaggccact cacaagacat caacttcacc cattgtcaag	300
	agcttcaaca ggaatgagtg ttag	324
	<210> 28	
	<211> 5	
20	<212> PRT	

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 28  
 Asp Tyr Glu Met His 1 5  
 10 <210> 29  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 29  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His  
 20 1 5 10  
 <210> 30  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30 <400> 30  
 Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 31  
 <211> 10  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40 <400> 31  
 Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala  
 1 5 10  
 45 <210> 32  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 32

Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr  
1 5

5 <210> 33  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 33

15 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His  
1 5 10 15

<210> 34  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

25 <400> 34

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

30 <210> 35  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 35

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Leu Thr  
1 5 10

40 <210> 36  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

50 <400> 36  
gactatgaaa tgcac 15

<210> 37  
<211> 30  
<212> ADN

55

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 37  
 ggctacacat ttactgacta tgaaatgcac 30  
 10 <210> 38  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 38  
 gctattgatc ctgaaactgg tggactgcc tacaatcaga agtcaaggg c 51  
 20 <210> 39  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 39  
 30 gctattgatc ctgaaactgg tggactgcc 30  
 <210> 40  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 40 <400> 40  
 tatgattacg acgggttgc ttac 24  
 <210> 41  
 <211> 48  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 50 <400> 41  
 agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct atttacat 48  
 <210> 42  
 55 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 42  
 aaagttcca accgatttc t 21  
 65 <210> 43



<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

<400> 43  
tctcaaaata cacatgttcc tccgctcacg 30

10 <210> 44  
<211> 325  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 44

# ES 2 913 162 T3

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

# ES 2 913 162 T3

245

250

255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly  
325

<210> 45

<211> 978

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

10 <400> 45

# ES 2 913 162 T3

gctagcaciaa aaggccctc tgtcttccct ctggtccct gctcccgtc cacctccgag	60
tccactgccg ctctgggtg tctggtcaag gattacttcc ctgagccagt cactgtgagt	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggagtc cacacatttc ccgctgtgct gcagagctcc	180
ggcctgtact ccctgtctag tgtggtcacc gtgccttcaa gcaatttcgg gactcagacc	240
tatacatgca acgtggacca taagccatct aatactaagg tcgataaaac cgtggagcga	300
aaatgctgcg tggaatgcc accttgtcct gctccaccag ccgctgcacc aagcgtgttc	360
ctgtttcctc caaagcccaa agacacactg atgatcagca gaactcctga ggtcacctgc	420
gtggtcgtgg acgtgtcca cgaggatccc gaagtccagt ttaactggtg cgtggatggg	480
gtcgaagtgc ataatgcaa gactaaacct cgggaggaac agttcaactc tacctttaga	540
gtcgtgagtg tgctgacagt cgtgcaccag gactggctga acggaaagga gtataagtgc	600
aaagtgtcta ataagggcct gcccgccct atcgagaaaa caattagtaa gactaaaggc	660
cagccaaggg aaccccaggt gtacacactg cccctagtc gcgaggaaat gacaaagaac	720
caggctcac tgacttgtct ggtgaaaggg ttctatccat ccgacattgc cgtggagtgg	780
gaatctaata gacagcccga aaacaattac aagaccacac caccatgct ggacagcgat	840
ggatccttct ttctgtattc aaagctgacc gtggataaaa gccggtggca gcagggcaat	900
gtcttttcct gctctgtgat gcacgaagcc ctgcacaacc actacactca gaagtcctcg	960

tcctgtctc ctggtga 978

5

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 46

# ES 2 913 162 T3

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

5 <210> 47  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 47  
 cgtacggtcg ccgccccctc cgtgtttatt tttcctccat ctgacgaaca gctgaagagt 60  
 gggaccgcct ccgtggtgtg cctgctgaac aatttctacc cccgggaggc caaggtgcag 120  
 tggaaagtgc acaacgctct gcagtctggc aatagtcagg agtcagtgcac tgaacaggac 180  
 agcaaggatt ccacctattc tctgagctcc accctgacac tgagcaaagc agattacgaa 240  
 aagcacaaag tctatgcctg cgaagtgacc caccaggggc tgagcagtcc agtgaccaag 300  
 tcctttaaca ggggagagtg ttga 324

15 <210> 48  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 48

# ES 2 913 162 T3

```

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20          25          30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50          55          60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
          85          90          95

Leu Gln Thr Pro Pro
          100

```

<210> 49  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 49

```

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20          25          30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
          35          40          45

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

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

```

# ES 2 913 162 T3

	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala	
	85	90 95
	Thr Gln Phe Pro	
	100	
	<210> 50	
	<211> 12	
5	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polipéptido sintético	
10	<400> 50	
	Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	1 5 10	
15	<210> 51	
	<211> 98	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Polipéptido sintético	
	<400> 51	
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
	1 5 10 15	
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
	20 25 30	
	Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
	35 40 45	
	Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
	50 55 60	
	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	Ala Arg	
25	<210> 52	
	<211> 98	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
30		

# ES 2 913 162 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 52

5

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65          70          75          80

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

```

Ala Arg

<210> 53

<211> 98

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 53



# ES 2 913 162 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg

5 <210> 54  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Polipéptido sintético  
<400> 54

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10 15

15 <210> 55  
<211> 117  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

25 <400> 55

# ES 2 913 162 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser

115

- <210> 56
- 5 <211> 117
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polipéptido sintético
- <400> 56

# ES 2 913 162 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 57

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 57

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

# ES 2 913 162 T3

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

<210> 58

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 58

# ES 2 913 162 T3

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

115

- <210> 59
- 5 <211> 117
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polipéptido sintético
- <400> 59

# ES 2 913 162 T3

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

<210> 60

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 60

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

# ES 2 913 162 T3

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

<210> 61

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 61

# ES 2 913 162 T3

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

- 5 <210> 62
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polipéptido sintético
- <400> 62



# ES 2 913 162 T3

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

<210> 63

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 63

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

# ES 2 913 162 T3

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

5 <210> 64  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 64

# ES 2 913 162 T3

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

115

- <210> 65
- 5 <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polipéptido sintético
- <400> 65

# ES 2 913 162 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Ser Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 66

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 66

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

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

# ES 2 913 162 T3

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Ser Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 67

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 67

# ES 2 913 162 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Ser Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 68

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 68

# ES 2 913 162 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 69

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 69

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

Val His Ser

<210> 70

<211> 351

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

20

<400> 70

# ES 2 913 162 T3

```

cagggtccagc tgggtccagtc aggagccgaa gtgaagaaac ccgggagctc cgtgaaggtc      60
agttgcaaag cctccggcgg gactttcagc gactacgaga tgcactgggt gaggcaggct      120
ccaggacagg gactggagtg gatgggagct atcgatcctg aaacaggagg cactgcatac      180
aaccagaagt ttaaaggccg ggcgaccatt acagcagaca agtccacttc taccgcctat      240
atggagctgc gtagtctgcg gtctgaagat acagccgtct actattgtgc tgattacgac      300
tatgatggct tcgcctattg gggccagggg accctggtga cagtctcaag c                351

```

<210> 71

<211> 351

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

10

<400> 71

```

cagggtccagc tgggtccagtc aggagccgaa gtgaagaaac ccgggagctc cgtgaaggtc      60
agttgcaaag cctccggcgg gactttcagc gactacgaga tgcactgggt gaggcaggct      120
ccaggacagg gactggagtg gatgggagct atcgatcctg aaacaggagg cactgcatac      180
aaccagaagt ttaaaggccg ggtgaccatt acagcagaca agtccacttc taccgcctat      240
atggagctgt ctagtctgcg gtctgaagat acagccgtct actattgtgc tgattacgac      300
tatgatggct tcgcctattg gggccagggg accctggtga cagtctcaag c                351

```

15 <210> 72

<211> 351

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 72

```

cagggtccagc tgggtccagtc aggagccgaa gtgaagaaac ccgggagctc cgtgaaggtc      60
agttgcaaag cctccggcgg gactttcagc gactacgaga tgcactgggt gaggcaggct      120
ccaggacagg gactggagtg gatgggagct atcgatcctg aaacaggagg cactgcatac      180
aaccagaagt ttaaaggccg ggtgaccatt acagcagaca agtccacttc taccgcctat      240
atggagctgc gtagtctgcg gtctgaagat acagccgtct actattgtgc tgattacgac      300
tatgatggct tcgcctattg gggccagggg accctggtga cagtctcaag c                351

```

25

<210> 73



<211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 73  
 atggaatggt cttgggtctt tctgttctt ctgtctgtca caaccggagt gcatagc 57

10 <210> 74  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

20 <400> 74

caggtccagc tgggtccagtc aggagccgag gtgaagaaac ccggcagctc cgtgaaggtc	60
agttgcaagg ccagcgggta cacattcagc gattatgaga tgcactgggt caggcaggca	120
ccaggacagg gactggagtg gatcggagca attgaccctg aaacaggcgg gactgcctac	180
aaccagaagt ttaaaggccg ggccaccatc acagctgata agtcaactag caccgcttat	240
atggagctgc ggtccctgag atctgaagac actgcagtgt actattgtac cgactacgat	300
tatgacgggt tgcctactg ggggcaggga accctggtga cagtctctag t	351

<210> 75  
 <211> 57  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

30 <400> 75  
 atggaatggt catgggtctt tctgttctt ctgtcagtca caaccggagt gcatagc 57

35 <210> 76  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 76

caggtccagc tgggtgcagtc aggagccgaa gtgaagaaac ccggcgcata cgtgaaggtc	60
tcttgcaaag ccagcgggta caccttcaca gactatgaga tgcactgggt ccgacaggca	120
ccaggacagg gactggagtg gatgggagct atcgatcctg aaacaggcgg gactgcatac	180

# ES 2 913 162 T3

	aaccagaagt ttaaaggccg ggtgactatg accgcagaca catcaactag caccgcctat	240
	atggagctga gctccctgag gagcgaagat accgccgtgt actattgtgc tgattacgac	300
	tatgatgggt tcgcttactg ggggcagggg accctggtga cagtctctag t	351
5	<210> 77 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético  <400> 77	
	cagggccagc tgggtgcagtc aggagccgaa gtgaagaaac ccggcgcatc cgtgaaggtc	60
	tcttgcaaag ccagcgggta caccttcaca gactatgaga tgcactgggt ccgacaggca	120
	ccaggacagg gactggagtg gatgggagct atcgatcctg aaacaggcgg gactgcatac	180
	aaccagaagt ttaaaggccg ggcgactatg accgcagaca catcaactag caccgcctat	240
	atggagctga gctccctgag gagcgaagat accgccgtgt actattgtgc tgattacgac	300
	tatgatgggt tcgcttactg ggggcagggg accctggtga cagtctctag t	351
15	<210> 78 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético  <400> 78	
	cagggccagc tgggtgcagtc aggagccgaa gtgaagaaac ccggcgcatc cgtgaaggtc	60
	tcttgcaaag ccagcgggta caccttcaca gactatgaga tgcactgggt ccgacaggca	120
	ccaggacagg gactggagtg gatgggagct atcgatcctg aaacaggcgg gactgcatac	180
	aaccagaagt ttaaaggccg ggtgactatg accgcagaca aatcaactag caccgcctat	240
	atggagctga gctccctgag gagcgaagat accgccgtgt actattgtgc tgattacgac	300
25	tatgatgggt tcgcttactg ggggcagggg accctggtga cagtctctag t	351
30	<210> 79 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Polinucleótido sintético	

<400> 79  
atggaatggt catgggtctt tctgtcttt ctgtccgtca caaccggggt ccactct 57

5 <210> 80  
<211> 351  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

<400> 80

caggtgcagc	tggtgcagtc	tgggagcgag	ctgaagaaac	ccggggcatc	agtgaaggtc	60
agctgcaaag	cctccggata	caccttcaca	gactatgaga	tgactgggt	gcggcaggca	120
ccaggacagg	gactggagt	gatgggcgct	atcgatcctg	aaactggcgg	gaccgcatac	180
aaccagaagt	ttaaaggag	attcgtgttt	agtctggaca	catctgtcag	tactgcctat	240
ctgcagatta	gctccctgaa	ggccgaagat	accgctgtct	actattgtgc	tgactacgat	300
tacgacggct	tcgcctattg	ggggcaggga	acactggtca	ctgtctcttc	t	351

<210> 81  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

25 <400> 81  
atggaatggt ctgggtctt tctgtcttt ctgtctgtca caaccggggt ccactct 57

<210> 82  
<211> 351  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

35 <400> 82

caggtccagc	tggtccagag	tggggctgaa	gtgaagaaac	ccggcagctc	cgtgaaggtc	60
agttgcaaag	cctccgggta	caccttcaca	gactatgaga	tgactgggt	gaggcaggca	120
ccaggacagg	gactggagt	gatgggagct	atcgatcctg	aaaccggcgg	gacagcctac	180
gctcagaagt	ttcagggccg	ggcgactatt	accgctgaca	aatccacatc	tactgcatat	240
atggagctgc	gtagtctgcg	gagcgaagat	acagcagtct	actattgtgc	cgattacgac	300
tatgatgggt	tcgcctactg	ggggcaggga	actctggtga	ccgtctcaag	c	351

<210> 83  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 83  
 10  
 caggtccagc tgggtccagag tgggggctgaa gtgaagaaac ccggcagctc cgtgaaggtc 60  
 agttgcaaag cctccgggta caccttcaca gactatgaga tgcactgggt gaggcaggca 120  
 ccaggacagg gactggagtg gatgggagct atcgatcctg aaaccggcgg gacagcctac 180  
 gctcagaagt ttcagggccg ggtgactatt accgctgaca aatccacatc tactgcatat 240  
 atggagctgc gtagtctgcg gagcgaagat acagcagtct actattgtgc cgattacgac 300  
 tatgatgggt tcgcctactg ggggcaggga actctggtga ccgtctcaag c 351  
 <210> 84  
 <211> 57  
 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 20  
 <400> 84  
 atggaatggt cttgggtctt tctgttctt ctgagcgtga ctaccggagt gcatagc 57  
 <210> 85  
 25  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 85  
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Asp Ala Arg Cys  
 20  
 35  
 <210> 86  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 86	
	gatattgtga tgacccagtc tcctctgtcc ctgccagtga caccaggaga gcctgcctct 60
	atcagttgca ggagctcca gtctctggtc cacagtaacg gcaatactta cctgcattgg 120
	tatctgcaga agccaggga gagccccag ctgctgatct ccaaagtgtc aaaccggttc 180
5	agcggagtcc ctgacagatt ttcaggcagc gggccggaa ccgatttcac actgaagatt 240
	tcccgggtgg aggctgaaga cgtgggcgtc tacttttgtt ctcagaatac ccacgtgccc 300
	cctctgactt ttggcggggg aaccaaggtc gagatcaag 339
<210> 87	
<211> 339	
<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial
<220>	
<223> Polinucleótido sintético	
<400> 87	
	gatattgtga tgacccagtc tcctctgtcc ctgtcaatca caccaggaga gcaggcctct 60
	atcagttgca ggagctcca gtctctggtc cacagtaacg gcaatactta cctgcattgg 120
	tatctgcaga agccaggga gagccccag ctgctgatct ccaaagtgtc aaaccggttc 180
	agcggagtcc ctgacagatt ttcaggcagc gggccggaa ccgatttcac actgaagatt 240
	tcccgggtgg aggctgaaga cgtgggcgtc tacttttgtt ctcagaatac ccacgtgccc 300
	cctctgactt ttggcggggg aaccaaggtc gagatcaag 339
<210> 88	
20	<211> 60
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
25	<223> Polinucleótido sintético
<400> 88	
atgtccgtgc ctactcaggt gctggggctg ctgctgctgt ggctgaccga tgcccgtgc 60	
<210> 89	
30	<211> 339
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
35	<223> Polinucleótido sintético
<400> 89	

# ES 2 913 162 T3

	gatgtcgtga tgacccagtc tcctctgagc ctgccagtga caccaggaga gcctgcctct	60
	atcagttgca ggagctccca gtcactggtc cacagcaacg gcaatactta cctgcattgg	120
	tatctgcaga agccagggca gtccccccag ctgctgatct ctaaagtgag taaccgggttc	180
	tctggagtcc ctgacagatt ttcaggcagc gggtcggaa ccgatttcac actgaagatt	240
	agtcgggtgg aggctgaaga cgtgggcgtc tacttctgtt ctcagaatac ccacgtgcc	300
	cctctgactt ttggcggggg aaccaaggtc gagatcaag	339
5	<210> 90 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 90 atgtccgtgc ctactcaggt gctggggctg ctgctgctgt ggctgaccga tgcccgatgt 60	
15	<210> 91 <211> 339 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 91	
	gatgtcgtga tgacccagtc tcctctgagc ctgccagtga caccaggaga gcctgcctct	60
	atcagttgca ggagctccca gtcactggtc cacagcaacg gcaatactta cctgcattgg	120
	tatctgcaga agccagggca gtccccccag ctgctgatct ctaaagtgag taaccgggttc	180
	tctggagtcc ctgacagatt ttcaggcagc gggtcggaa ccgatttcac actgaagatt	240
	agtcgggtgg aggctgaaga cgtgggcgtc tacttctgtt ctcagaatac ccacgtgcc	300
25	cctctgactt ttggcggggg aaccaaggtc gagatcaag	339
30	<210> 92 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
35	<400> 92 atgagcgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgactga tgcccgatgt 60	
40	<210> 93 <211> 172	

# ES 2 913 162 T3

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 93

5

```

Met Ser Ser Lys Arg Ala Lys Thr Lys Thr Thr Lys Lys Arg Pro Gln
1          5          10          15

Arg Ala Thr Ser Asn Val Phe Ala Met Phe Asp Gln Ser Gln Ile Gln
          20          25          30

Glu Phe Lys Glu Ala Phe Asn Met Ile Asp Gln Asn Arg Asp Gly Phe
          35          40          45

Ile Asp Lys Glu Asp Leu His Asp Met Leu Ala Ser Met Gly Lys Asn
          50          55          60

Pro Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Ala Met Met Asn Glu Ala Pro Gly Pro
65          70          75          80

Ile Asn Phe Thr Met Phe Leu Thr Met Phe Gly Glu Lys Leu Asn Gly
          85          90          95

Thr Asp Pro Glu Asp Val Ile Arg Asn Ala Phe Ala Cys Phe Asp Glu
          100          105          110

Glu Ala Ile Gly Thr Ile Gln Glu Asp Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Thr
          115          120          125

Thr Met Gly Asp Arg Phe Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Leu Tyr Arg
          130          135          140

Glu Ala Pro Ile Asp Lys Lys Gly Asn Phe Asn Tyr Ile Glu Phe Thr
          145          150          155          160

Arg Ile Leu Lys His Gly Ala Lys Asp Lys Asp Asp
          165          170

```

10 <210> 94  
<211> 172  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

15 <400> 94

# ES 2 913 162 T3

```

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

```

5 <210> 95  
 <211> 171  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 95



# ES 2 913 162 T3

```

Met Ser Ser Lys Arg Thr Lys Thr Lys Thr Lys Lys Arg Pro Gln Arg
1      5      10      15

Ala Thr Ser Asn Val Phe Ala Met Phe Asp Gln Ser Gln Ile Gln Glu
      20      25      30

Phe Lys Glu Ala Phe Asn Met Ile Asp Gln Asn Arg Asp Gly Phe Ile
      35      40      45

Asp Lys Glu Asp Leu His Asp Met Leu Ala Ser Leu Gly Lys Asn Pro
      50      55      60

Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Ala Met Met Asn Glu Ala Pro Gly Pro Ile
65      70      75      80

Asn Phe Thr Met Phe Leu Thr Met Phe Gly Glu Lys Leu Asn Gly Thr
      85      90      95

Asp Pro Glu Asp Val Ile Arg Asn Ala Phe Ala Cys Phe Asp Glu Glu
      100      105      110

Ala Thr Gly Thr Ile Gln Glu Asp Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Thr Thr
      115      120      125

Met Gly Asp Arg Phe Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Leu Tyr Arg Glu
      130      135      140

Ala Pro Ile Asp Lys Lys Gly Asn Phe Asn Tyr Ile Glu Phe Thr Arg
145      150      155      160

Ile Leu Lys His Gly Ala Lys Asp Lys Asp Asp
      165      170

```

5 <210> 96  
 <211> 172  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 96

# ES 2 913 162 T3

```

Met Ser Ser Lys Lys Ala Lys Thr Lys Thr Thr Lys Lys Arg Pro Gln
1      5      10      15

Arg Ala Thr Ser Asn Val Phe Ala Met Phe Asp Gln Ser Gln Ile Gln
      20      25      30

Glu Phe Lys Glu Ala Phe Asn Met Ile Asp Gln Asn Arg Asp Gly Phe
      35      40      45

Ile Asp Lys Glu Asp Leu His Asp Met Leu Ala Ser Leu Gly Lys Asn
      50      55      60

Pro Thr Asp Ala Tyr Leu Asp Ala Met Met Asn Glu Ala Pro Gly Pro
65      70      75      80

Ile Asn Phe Thr Met Phe Leu Thr Met Phe Gly Glu Lys Leu Asn Gly
      85      90      95

Thr Asp Pro Glu Asp Val Ile Arg Asn Ala Phe Ala Cys Phe Asp Glu
      100      105      110

Glu Ala Thr Gly Thr Ile Gln Glu Asp Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Thr
      115      120      125

Thr Met Gly Asp Arg Phe Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Leu Tyr Arg
      130      135      140

Glu Ala Pro Ile Asp Lys Lys Gly Asn Phe Asn Tyr Ile Glu Phe Thr
145      150      155      160

Arg Ile Leu Lys His Gly Ala Lys Asp Lys Asp Asp
      165      170

```

<210> 97

<211> 136

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

# ES 2 913 162 T3

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

[illegible]

- (21) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 62, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 66; y
- 5 (22) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 62, y una región variable de cadena ligera que comprende un péptido representado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 68.
2. El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo según la reivindicación 1 que comprende cadenas pesadas y ligeras, en el que la región constante de dicha cadena pesada es IgG.
- 10 3. El anticuerpo anti-Myl9 o su fragmento de unión a Myl9 según la reivindicación 2, en el que la región constante de dicha cadena pesada es la región constante de IgG2 humana.
- 15 4. El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo según la reivindicación 3, en el que dicha región constante de IgG2 humana posee mutaciones V234A y G237A.
5. El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicha región constante tiene la supresión del resto de lisina C-terminal.
- 20 6. El anticuerpo anti-Myl9 o fragmento de unión a Myl9 del mismo según la reivindicación 2, en el que la región constante de dicha cadena ligera comprende la región constante de Igk humana.
7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a Myl9 del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable.
- 25 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, para uso en el tratamiento de inflamación alérgica de las vías respiratorias o enfermedad inflamatoria del intestino.
9. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
- 30 10. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, para uso en el tratamiento del cáncer colorrectal, en la que la composición farmacéutica se usa en combinación con un anticuerpo anti-PD-1.

4

NP\_742116.1\_Myl9 de ratón  
NP\_006088.2\_Myl9 humana

61. I WENT TO THE GYM AND MET THE GENTLEST AND MOST DECENT AND  
62. I WENT TO THE GYM AND MET THE GENTLEST AND MOST DECENT AND  
63. I WENT TO THE GYM AND MET THE GENTLEST AND MOST DECENT AND

12 12 12  
12 12 12  
12 12 12

NP\_034989.1\_Myl3 de ratón  
NP\_000249.1\_Myl3 humana

[illegible]

NP\_034989.1\_My13 de ratón  
NP\_000249.1\_My13 humana

61 2EFKEAFLEFDRIHKGEMKITYGCGGVLRALGSMPTQAEVIRVLGXPRQEEINKNQDE 120  
\$2 2EFKEAFLEFDRIHKGEMKITYGCGGVLRALGSMPTQAEVIRVLGXPRQEEINKNQDE 111

112: \*TFLPLQHSKNDGTGTFVEGLRVEDGNGTNGAEHLHVLATIGERLTIEVER 160  
113: \*\*\*\*\*  
114: \*TFLPLQHSKNDGTGTFVEGLRVEDGNGTNGAEHLHVLATIGERLTIEVER 171  
115: \*\*\*\*\*

NP\_034989.1 Myl3 de ratón  
HP\_000249.1 Myl3 humana

18:18AGEDSNCINYEATPHNMS	208
172:18AGEDSNCINYEATPHNMS	209

NP\_034989.1 My13 de ratón  
NP\_742116.1 My19 de ratón

```

1:MAPKPEPRKDDAAAPRAAPAPAPAAAPAAPEPRHPEAEFDASKIKIEIEEQI 60
1:-----NSKRAKATIKKPEQRAISNVAEDQS 31

```

NP\_034989.1\_My13 de ratón  
NP\_742116.1\_My19 de ratón

61:EEFEZATLLFERTKGENKITTYCGDVLRALGQNETQAEVLRVLGKPKQEEELNSROADZ 120  
32:QEFKEAFNHDQNRDG--FIDKEDLHMDIASLGKOPTD-EYLEGMNEAEGFIN-----E 93

NP\_034989.1\_My13 de ratón  
NP\_742116.1\_My19 de ratón

04 TELNEGE--XINGTODRVIKAKOCEASGFIHEDRLITTINGRTIDEVDS 141  
1214 HIELENQHSKROSTIHEDEVGRVDEKNGTVMSALRHVLATIGELITEDEVK 180

NP\_034989.1\_My13 de ratón  
NP\_742116.1\_My19 de ratón

181: L-NAGQDSNGSCINYEATVTHIAS-----	204
192: MYREAPIDKSGHNYVEFTALKHGAKDD	172

NP\_000249.1\_Myl3 humana  
NP\_006088.2\_Myl9 humana

000  
1: 16APRPERKDDAAAKPAAPAPAPAPPEFFERFHEVEEDASKIKIETFEQIEZFKAFNL 60  
1: -----NSKRBAKITKKRPQSATNVFAHDSQIQEKFENFM 40

MP\_000249.1\_Myl3 humana  
MP\_006088.2\_Myl9 humana

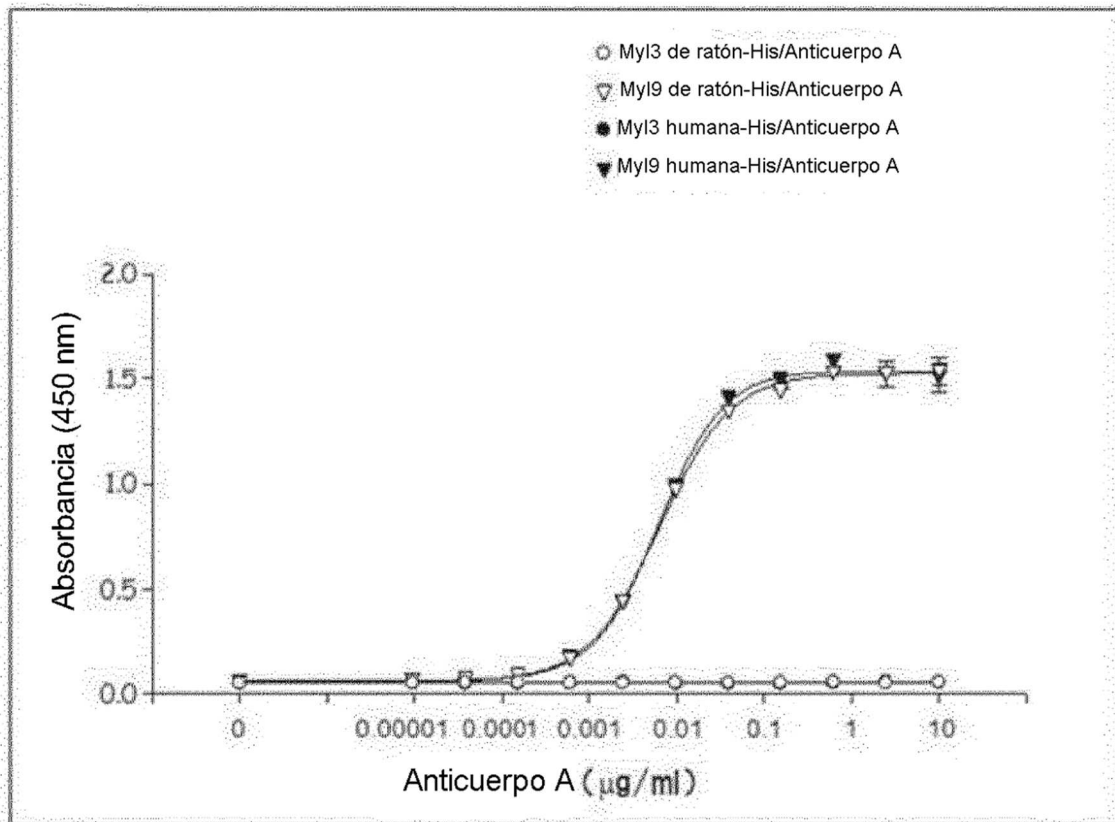
61:FDRIKCMXITYXCGDVRALGQNPIQAEVLRVLGKPRQELNTRGDDFIELPMQH 120  
41:IDQNRD-GF-IUXEDUHMMLASLGNPID-EYLEGNSEAPPIN-----FINELTMEGE 92

NP\_000249.1\_Myl3 humana  
NP\_006088.2\_Myl9 humana

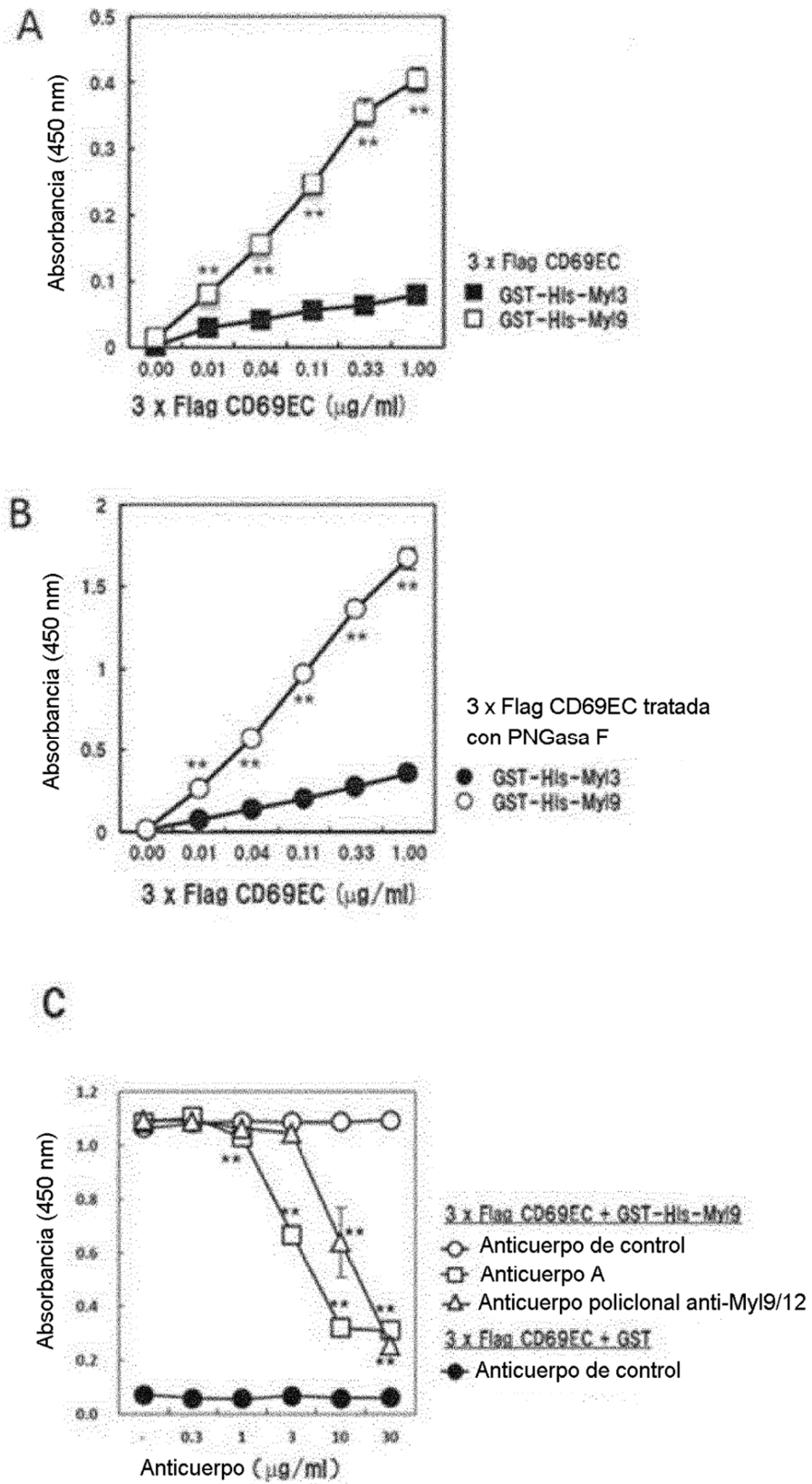
12: 1SKNKG1GYEDFVEGLRVDEKNGIYNMGLRHYLAIGERLIEDEVEKL-NAGQEDS 179  
93: --KLNGHDPEDVIRNAPACEDEASG1HEH1LAETL1NGERLIEDEVEKHYR1APDK 150

NP\_000249.1\_Myl3 humana  
NP\_006088.2\_Myl9 humana

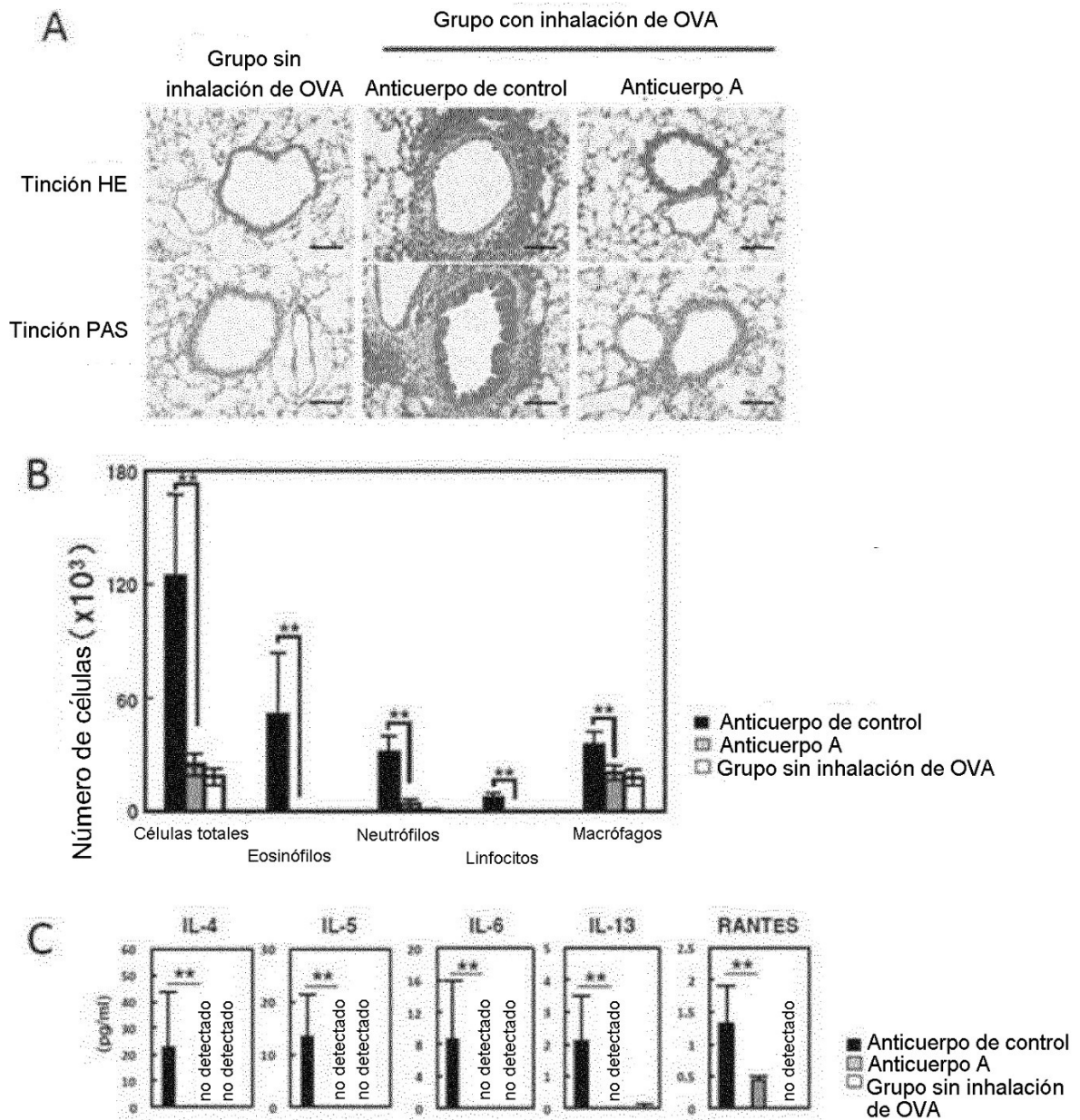
180: NGCINYEAFVYKHIMS-----  
151: KGNFNVEFETRI LKRGARDKDD

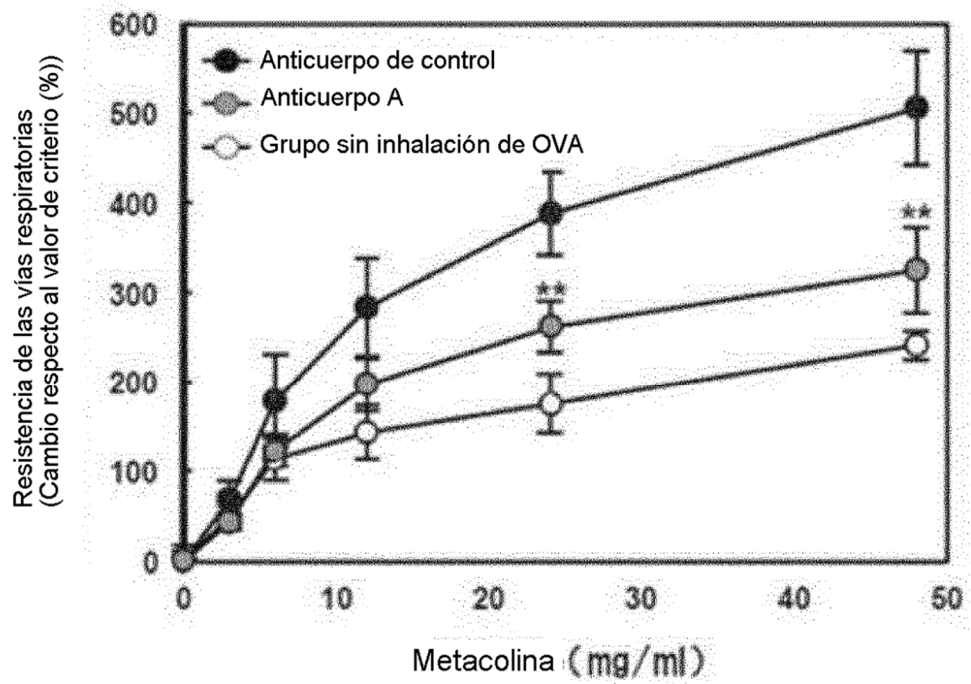
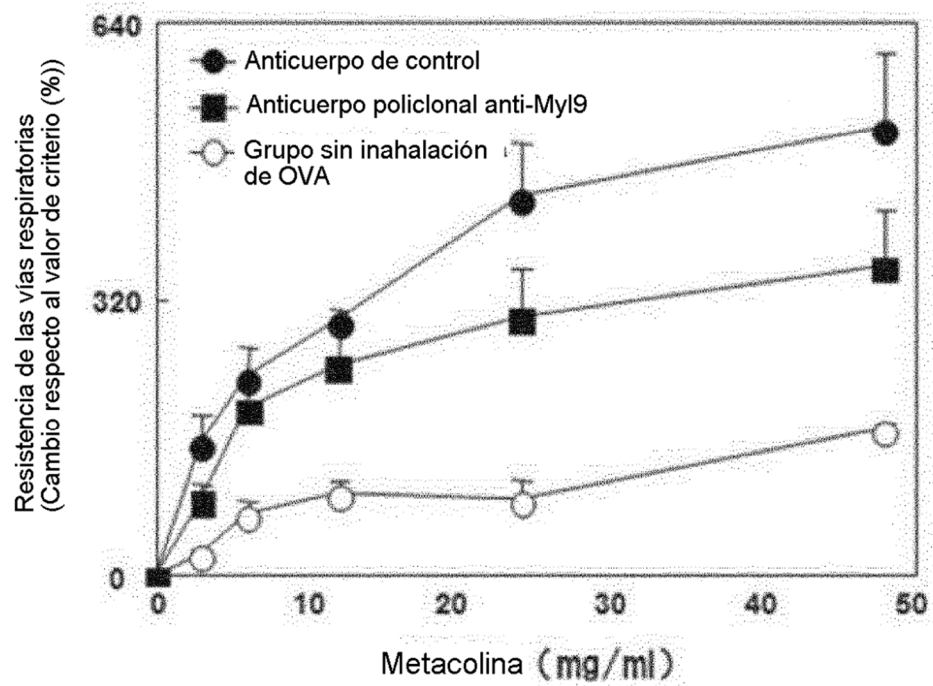
**Fig.2**



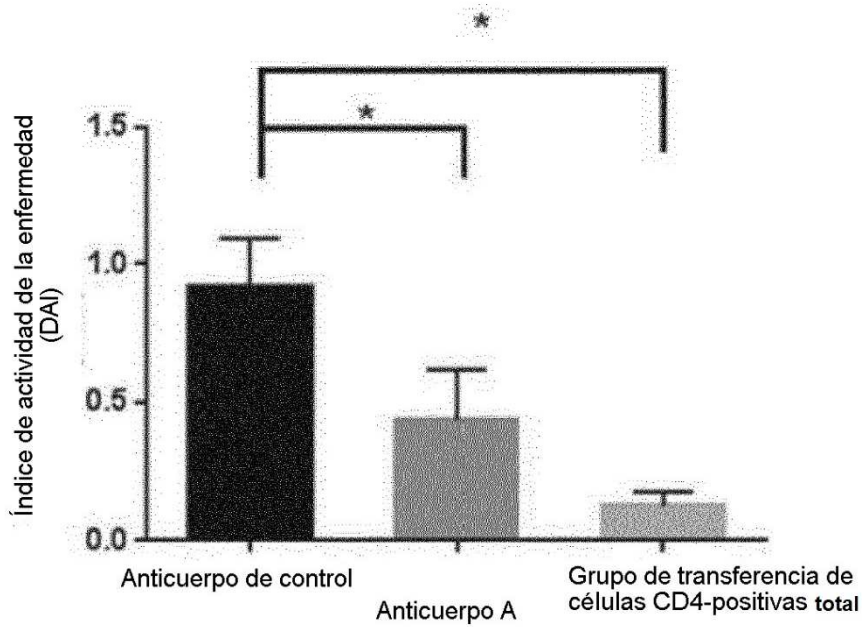
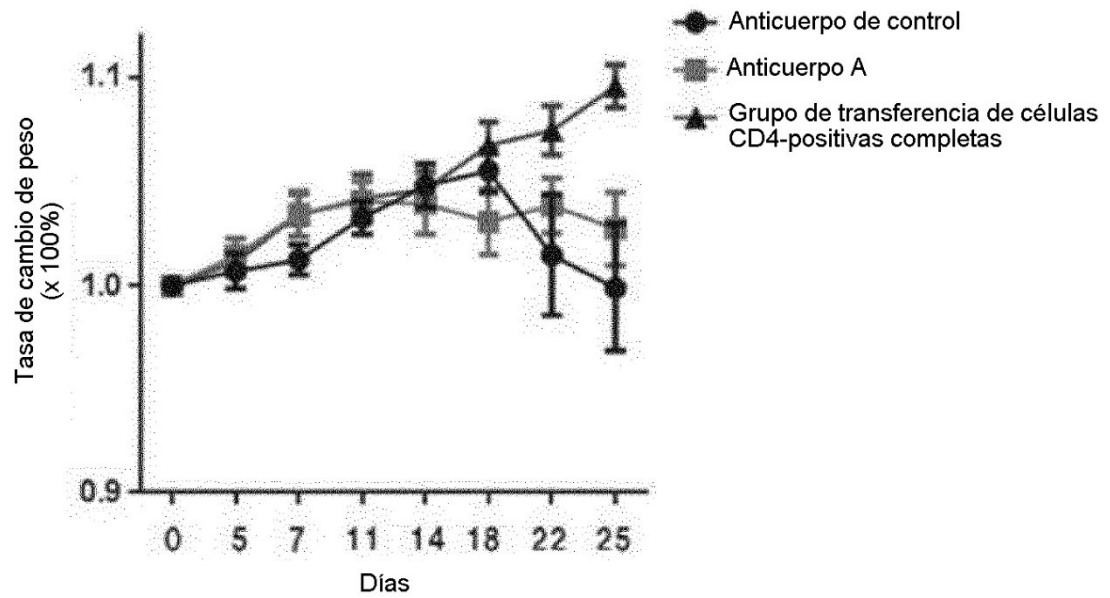
**Fig.3**

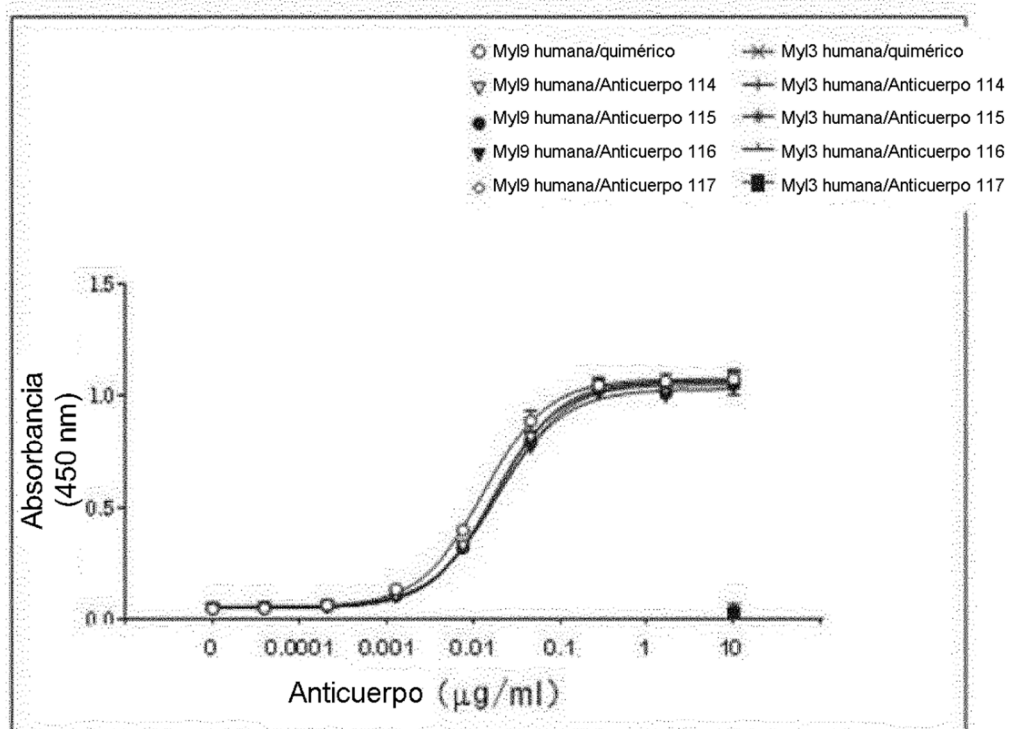
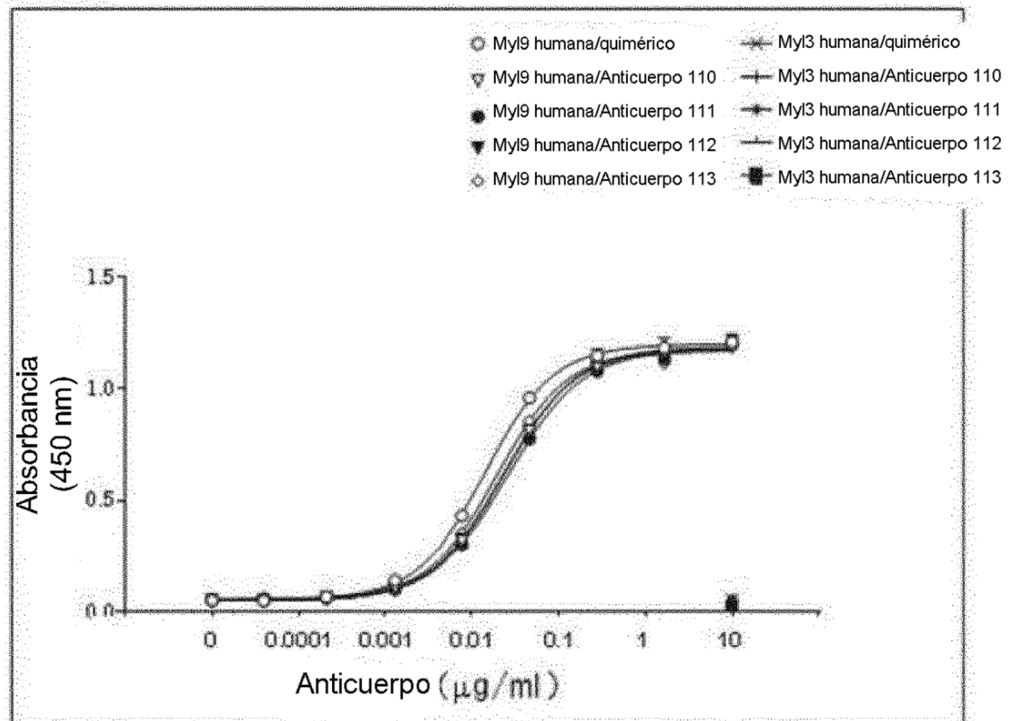
**Fig.4-1**



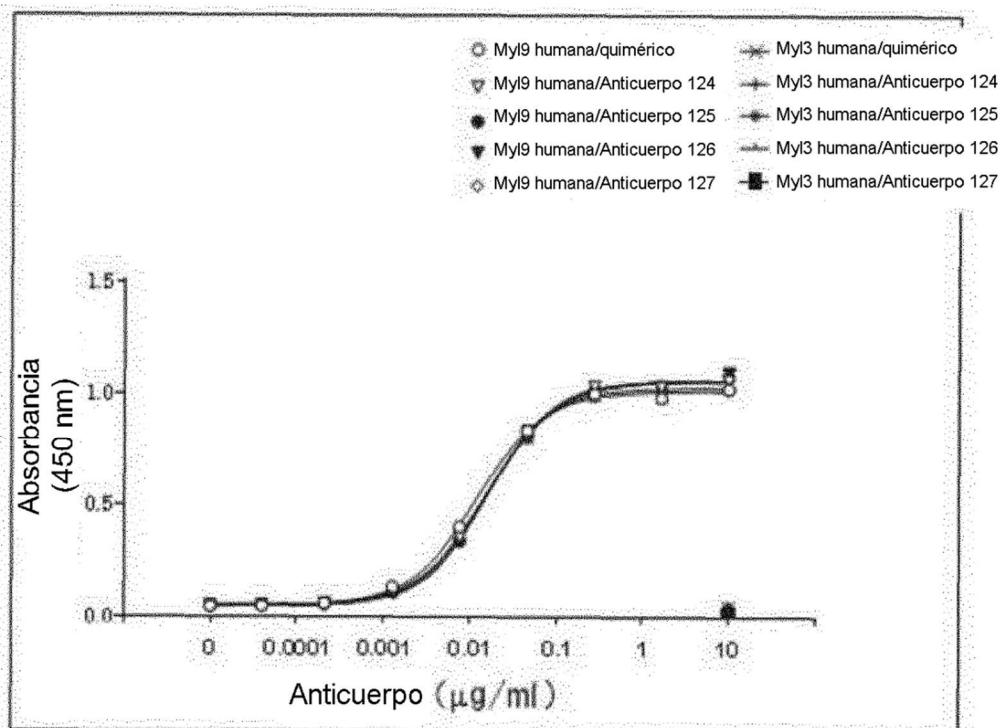
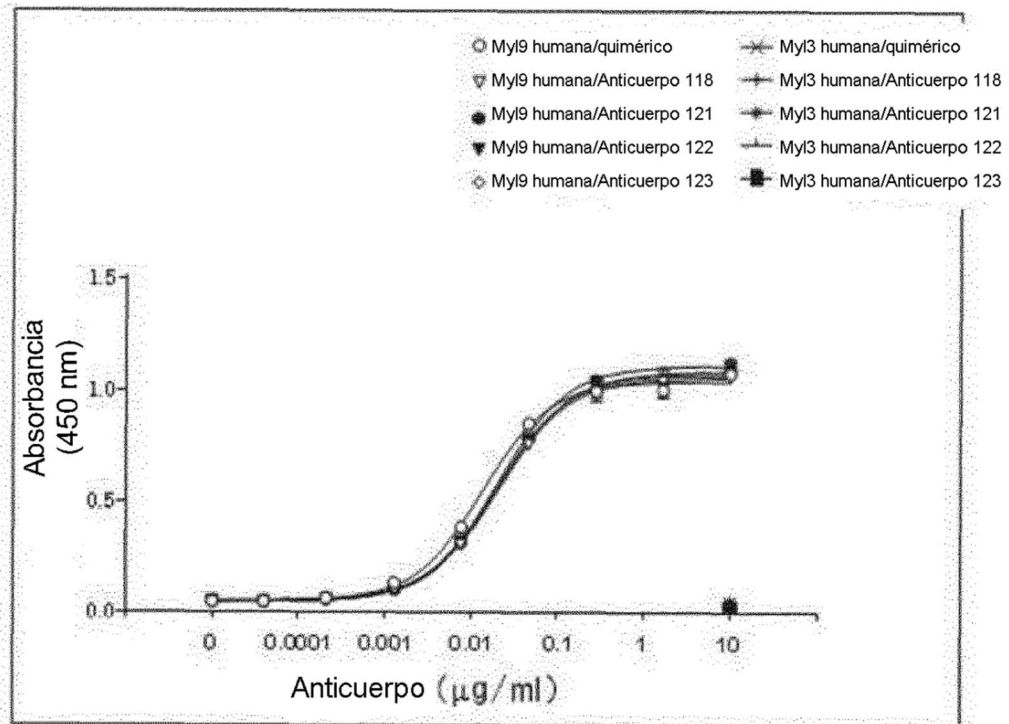
**Fig.4-2****D****E**

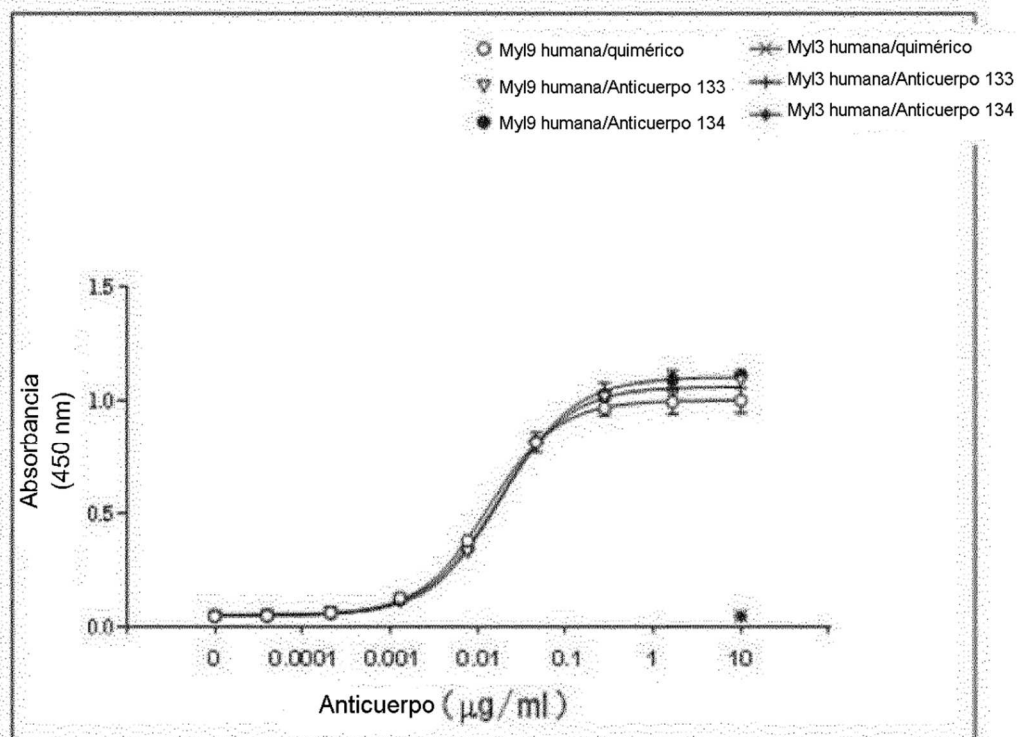
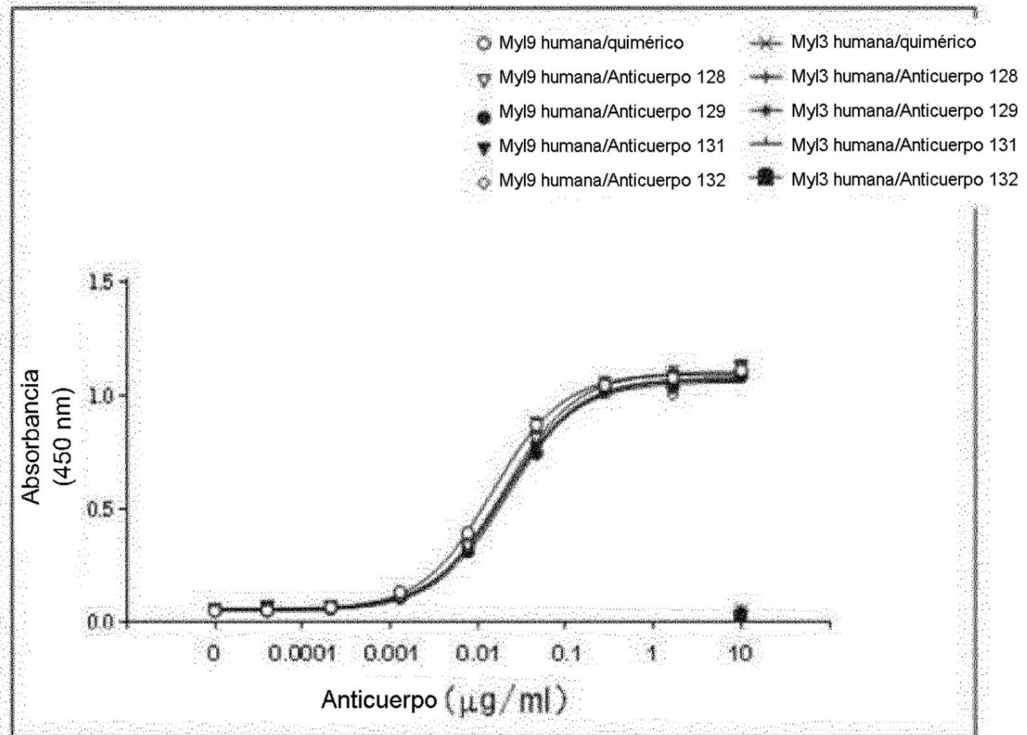
**Fig.5**



**Fig.6-1**

**Fig.6-2**



**Fig.6-3**

**Fig.7**

**A**

NP\_742116.1\_Myl9 de ratón  
NP\_080340.2\_Myl12a de ratón  
NP\_075891.1\_Myl12b de ratón

1:MSSKRAKATIKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHMLAS 60  
1:MSSKRAKATIKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHMLAS 60  
1:MSSKRAKATIKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHMLAS 60  
\*\*\*\*.\*\*.\*\*\*\*\*

NP\_742116.1\_Myl9 de ratón  
NP\_080340.2\_Myl12a de ratón  
NP\_075891.1\_Myl12b de ratón

61:LGKNPTDEYLEGMNEAPGPINFTMFLTMFGEKNGTDPEDVIRNAFACFDEEASGEIHE 120  
61:MGKNPTDEYLDAMNEAPGPINFTMFLTMFGEKNGTDPEDVIRNAFACFDEEATGTIQE 120  
61:LGKNPTDAYLDAMNEAPGPINFTMFLTMFGEKNGTDPEDVIRNAFACFDEEATGTIQE 120  
\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*

NP\_742116.1\_Myl9 de ratón  
NP\_080340.2\_Myl12a de ratón  
NP\_075891.1\_Myl12b de ratón

121:DHLRELLITMGDRFTDEEVDEMYREAPIDKKGNFNYYEFTIRILKHGAKDKDD 172  
121:DYLRELLITMGDRFTDEEVDELYREAPIDKKGNFNYYEFTIRILKHGAKDKDD 172  
121:DYLRELLITMGDRFTDEEVDELYREAPIDKKGNFNYYEFTIRILKHGAKDKDD 172  
\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

**B**

NP\_006088.2\_Myl9 humana  
NP\_001289976.1\_Myl12a humana  
NP\_001138416.1\_Myl12b humana

1:MSSKRAKATIKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHMLAS 60  
1:MSSKRTIKNT-KKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHMLAS 59  
1:MSSKRAKATIKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHMLAS 60  
\*\*\*\*.\*\*.\*\*\*\*\*

NP\_006088.2\_Myl9 humana  
NP\_001289976.1\_Myl12a humana  
NP\_001138416.1\_Myl12b humana

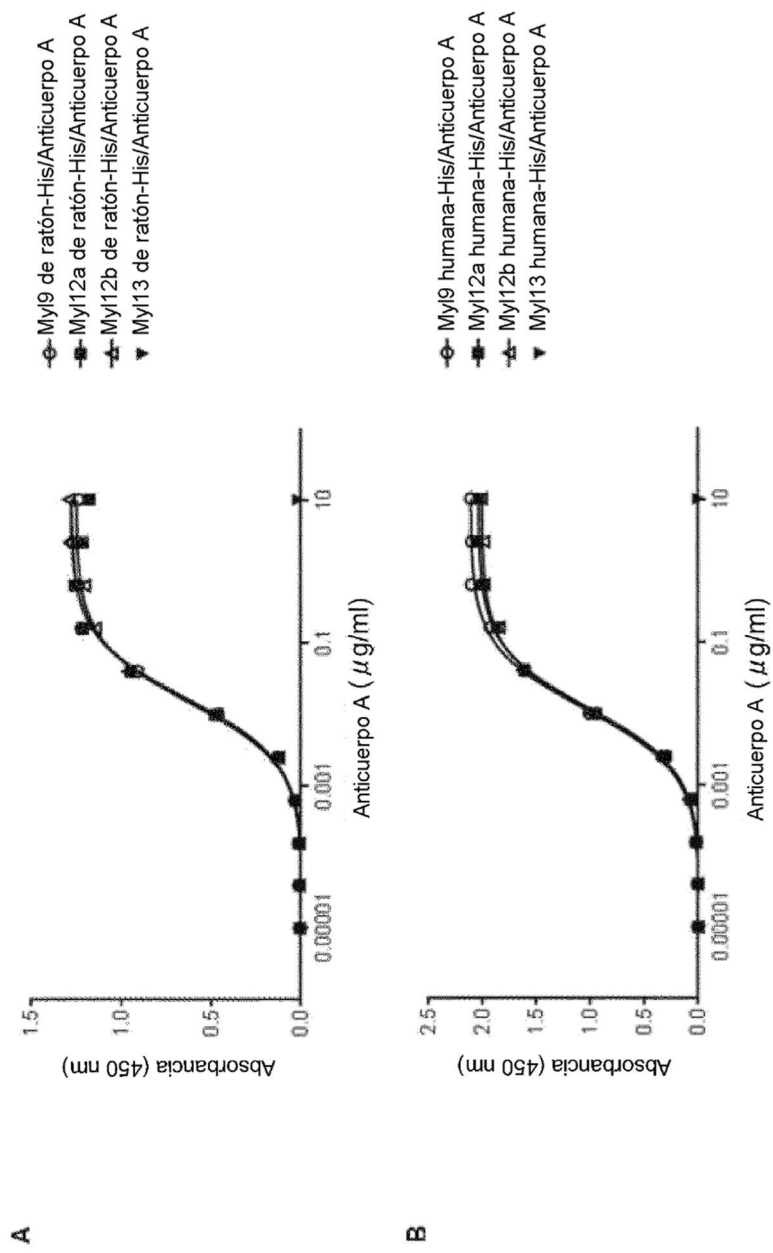
61:LGKNPTDEYLEGMNEAPGPINFTMFLTMFGEKNGTDPEDVIRNAFACFDEEASGEIHE 120  
60:LGKNPTDEYLDAMNEAPGPINFTMFLTMFGEKNGTDPEDVIRNAFACFDEEATGTIQE 119  
61:LGKNPTDAYLDAMNEAPGPINFTMFLTMFGEKNGTDPEDVIRNAFACFDEEATGTIQE 120  
\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*

NP\_006088.2\_Myl9 humana  
NP\_001289976.1\_Myl12a humana  
NP\_001138416.1\_Myl12b humana

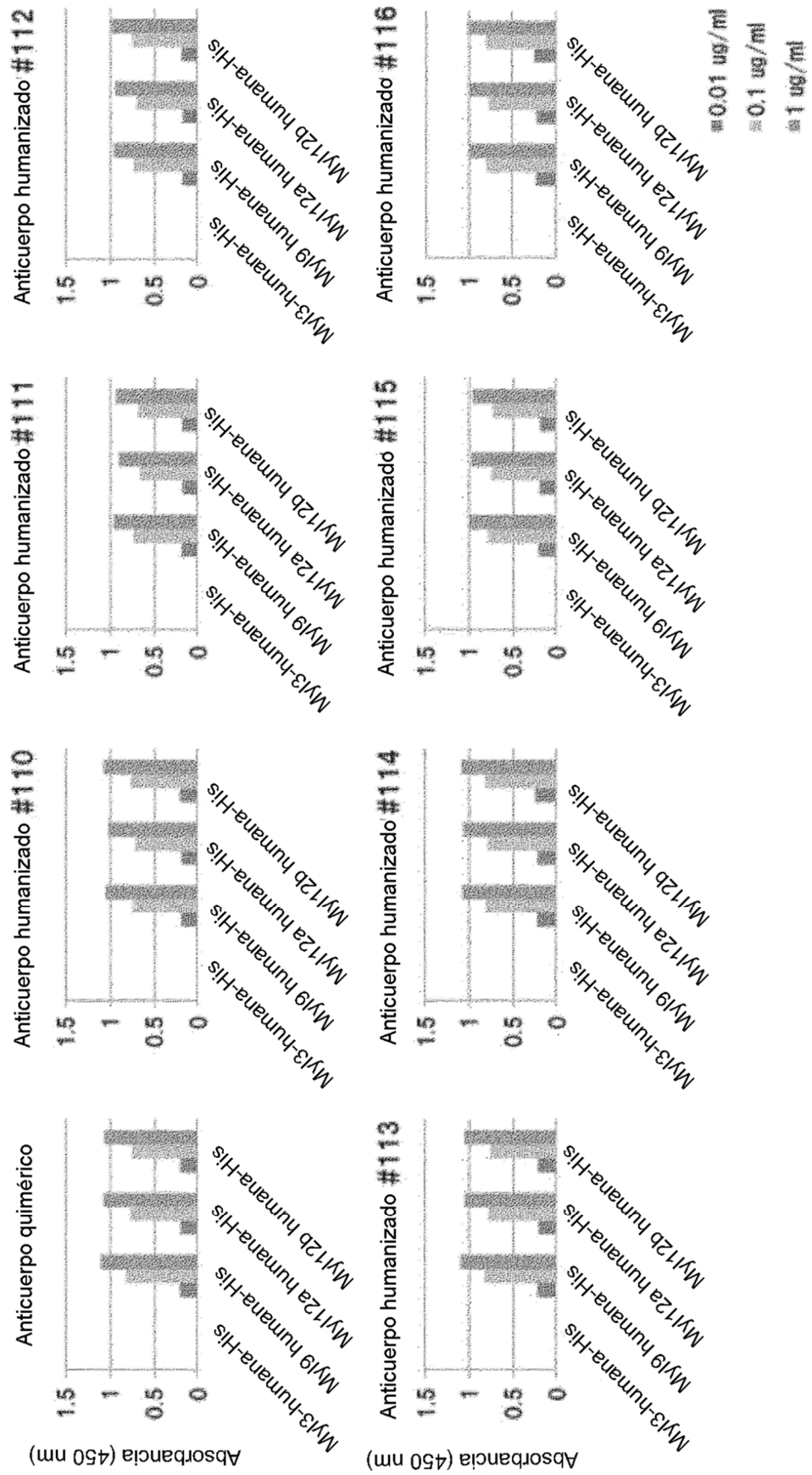
121:DHLRELLITMGDRFTDEEVDEMYREAPIDKKGNFNYYEFTIRILKHGAKDKDD 172  
120:DYLRELLITMGDRFTDEEVDELYREAPIDKKGNFNYYEFTIRILKHGAKDKDD 171  
121:DYLRELLITMGDRFTDEEVDELYREAPIDKKGNFNYYEFTIRILKHGAKDKDD 172  
\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*



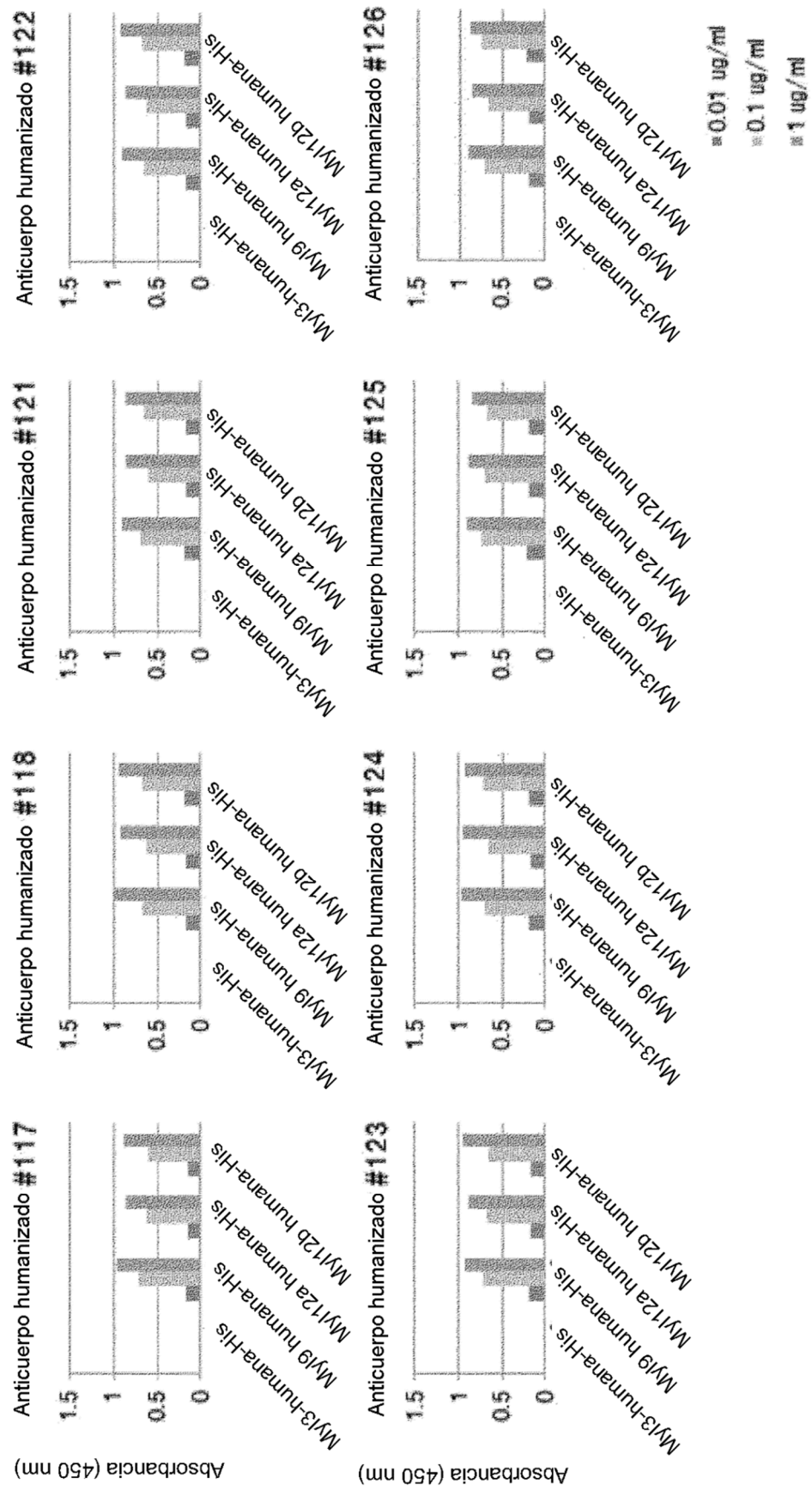
**Fig.8**



**Fig.9A**



**Fig.9B**



**Fig.9C**

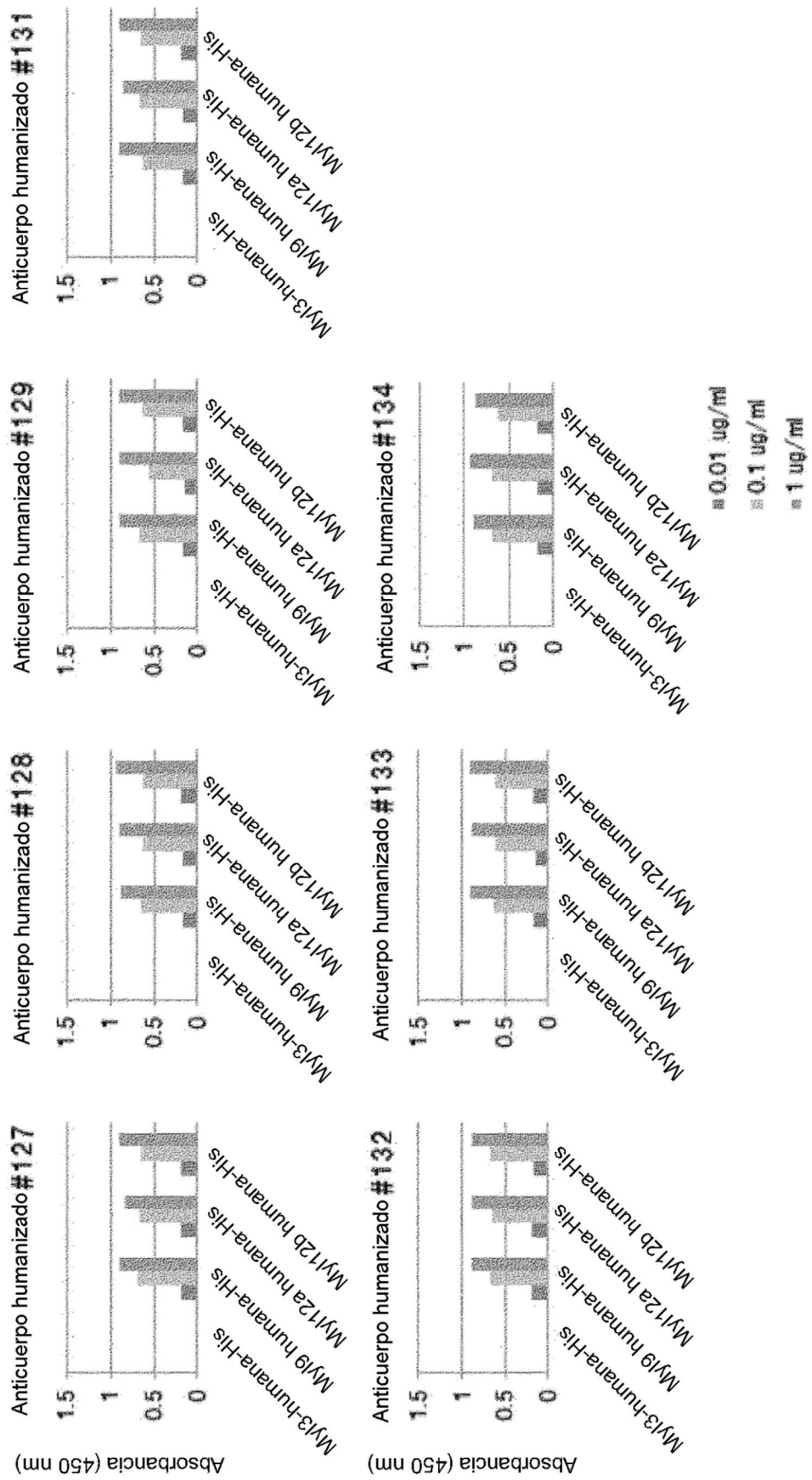
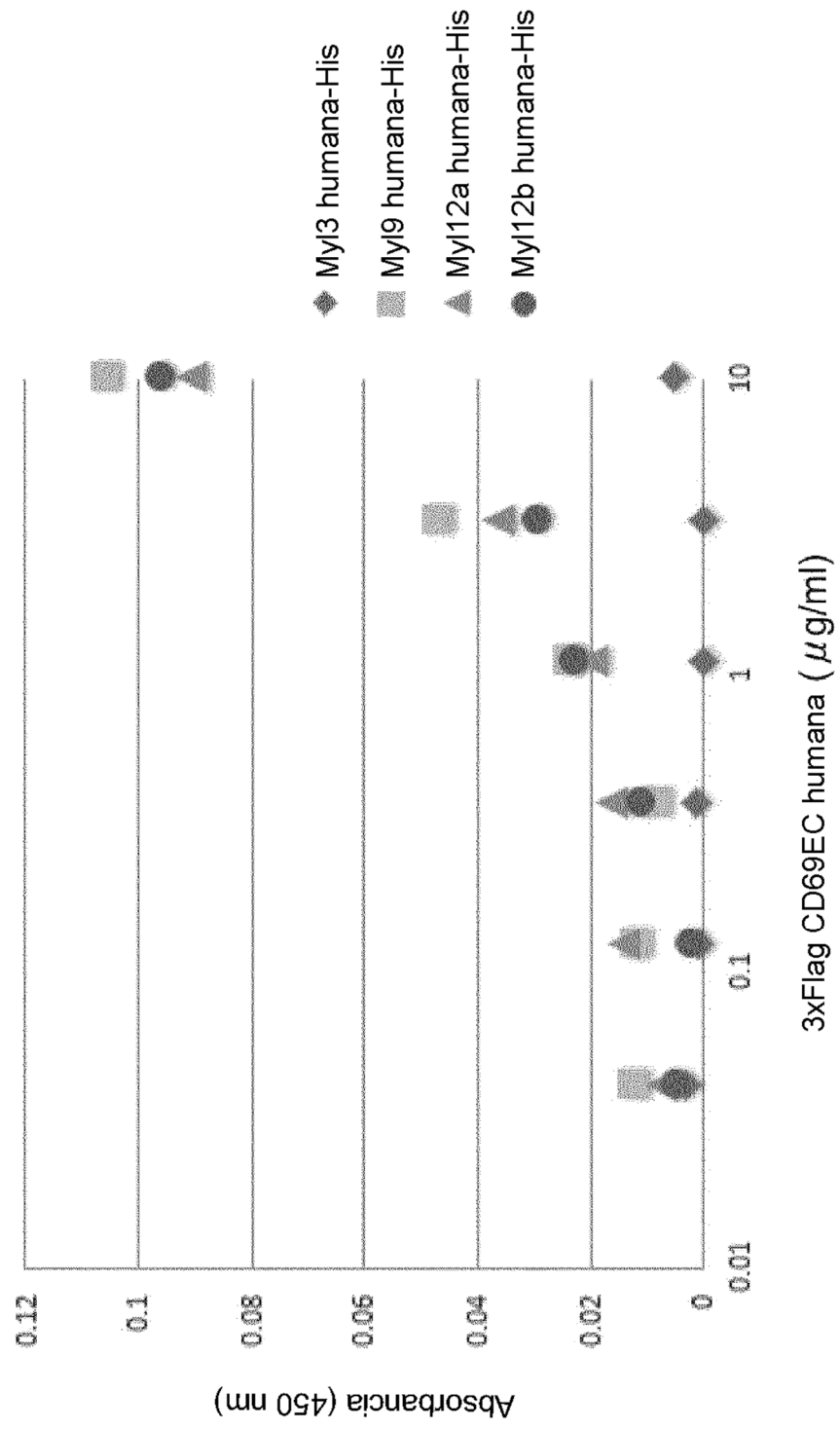


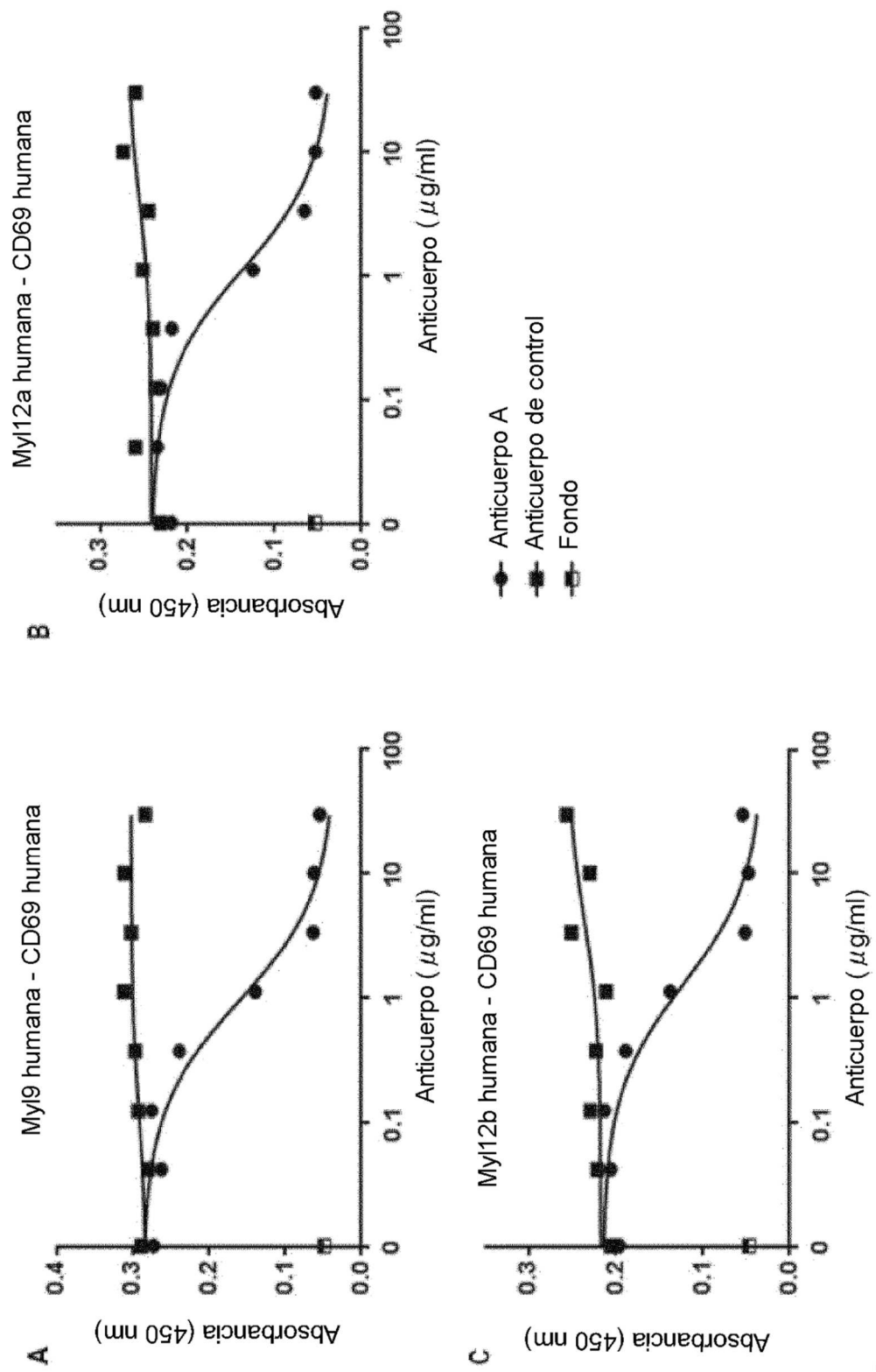
Fig.10

CD69 de ratón, región extracelular	1:NVGKYNCPGLYEKLESSDHHVATCKNEWISYKRTCYFFSITTKSWALAQRSCSEDAATLA 60
CD69 humana, región extracelular	1:--GQYNCPGQYTFSPSDESHVSSCSEEDWVGQKRCYFISTVKRSNTISAQACSEHGATLA 58 * **** * ** ** * * * * * ** ** ** *
CD69 de ratón, región extracelular	61:VIDSEKDMITFLKRYSGELEHNWIGLKNEANQITWKWANGKEFNSWENLTGSGRCVSVNHKNV 120
CD69 humana, región extracelular	59:VIDSEKDMNIFLKRYAGREHNWGLKKEFGHPKMSNGKEFNNWENVTGSDKCVFLKNIEV 118 ***** **** * ** ** * ** ***** ** ** *
CD69 de ratón, región extracelular	121:TAVDCEANFHWVCSKPSR 138
CD69 humana, región extracelular	119:SSMECEKNLYWICKPKYK 136 ** * * * *

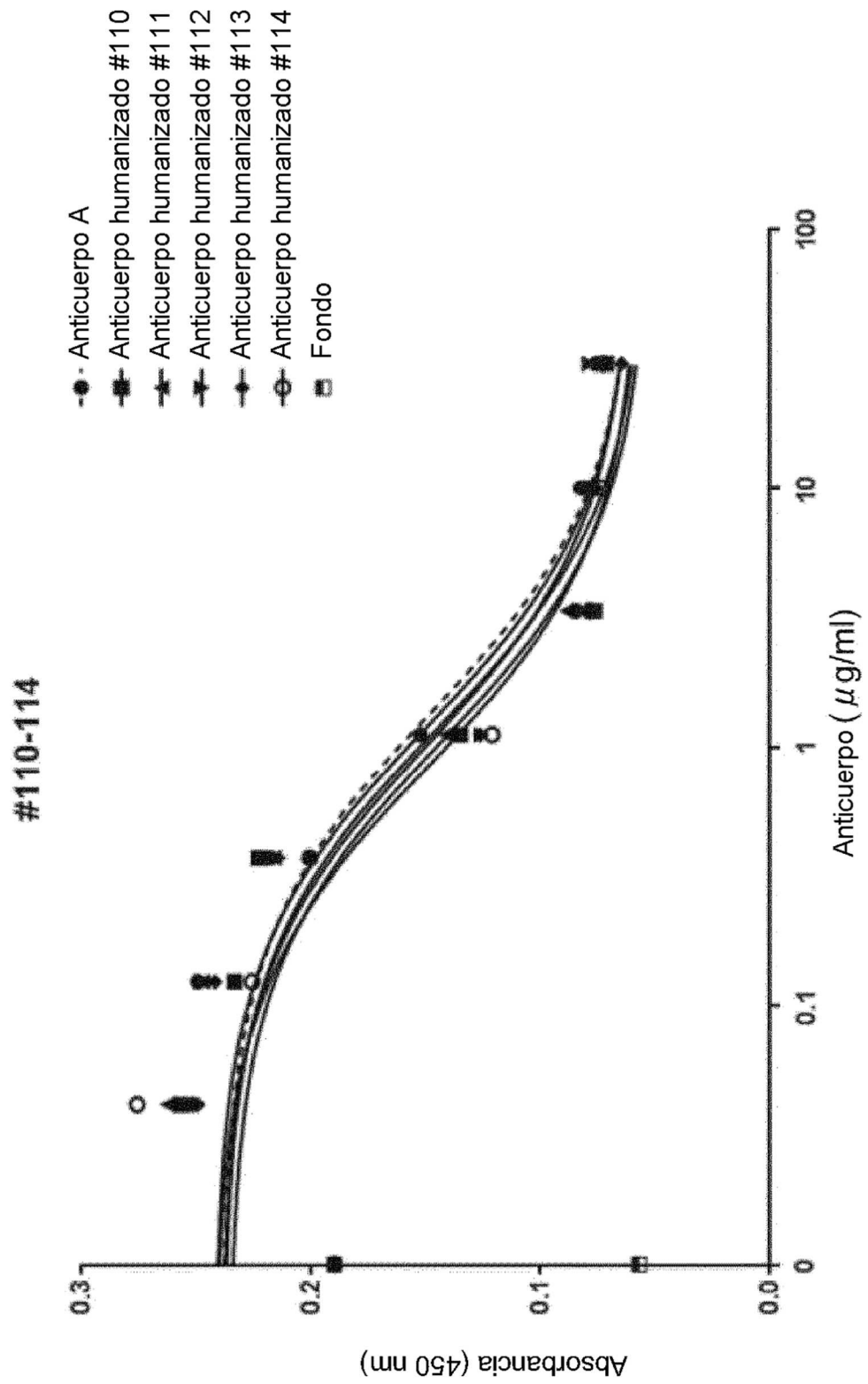
**Fig.11**



**Fig.12**

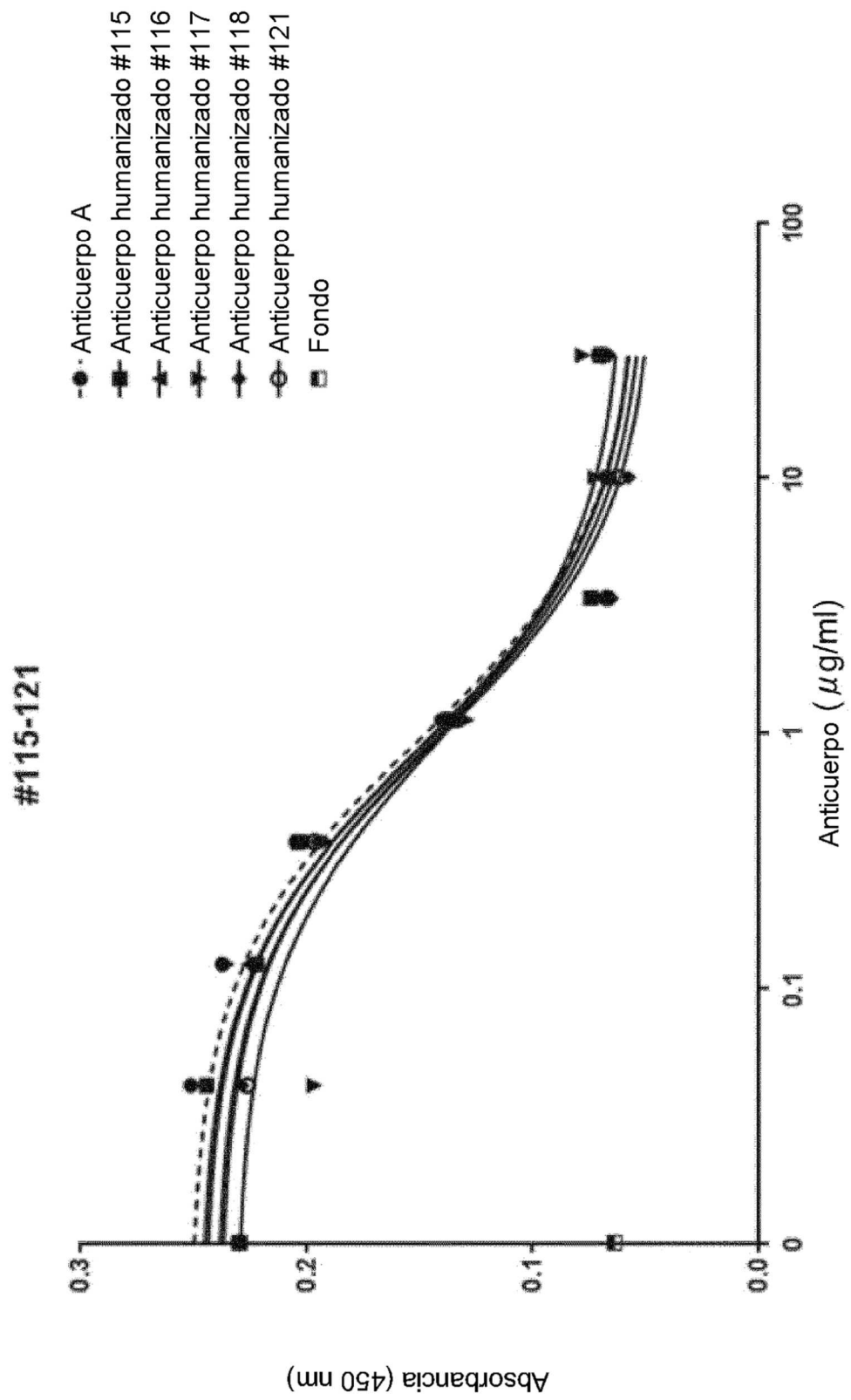


**Fig.13-1**

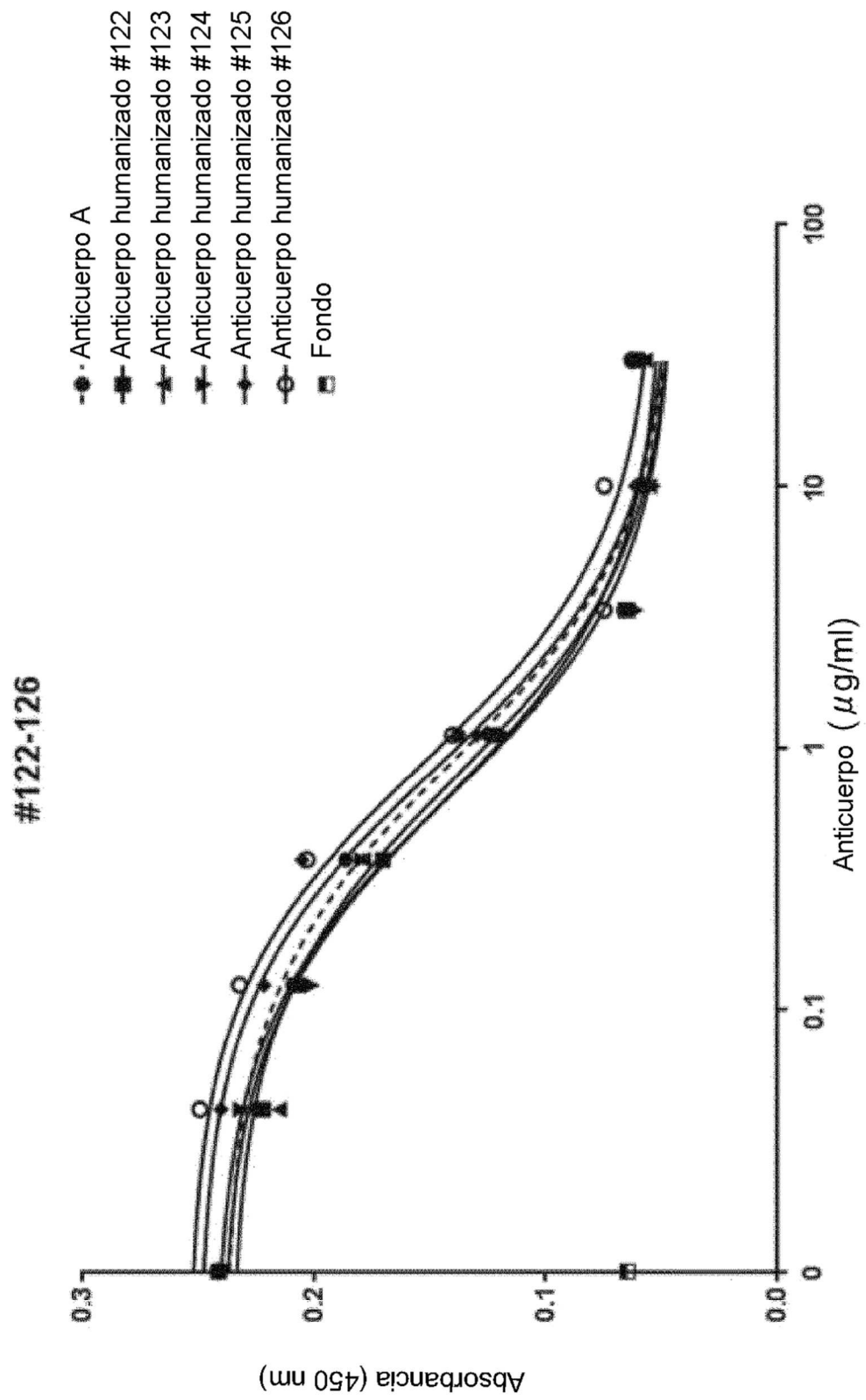




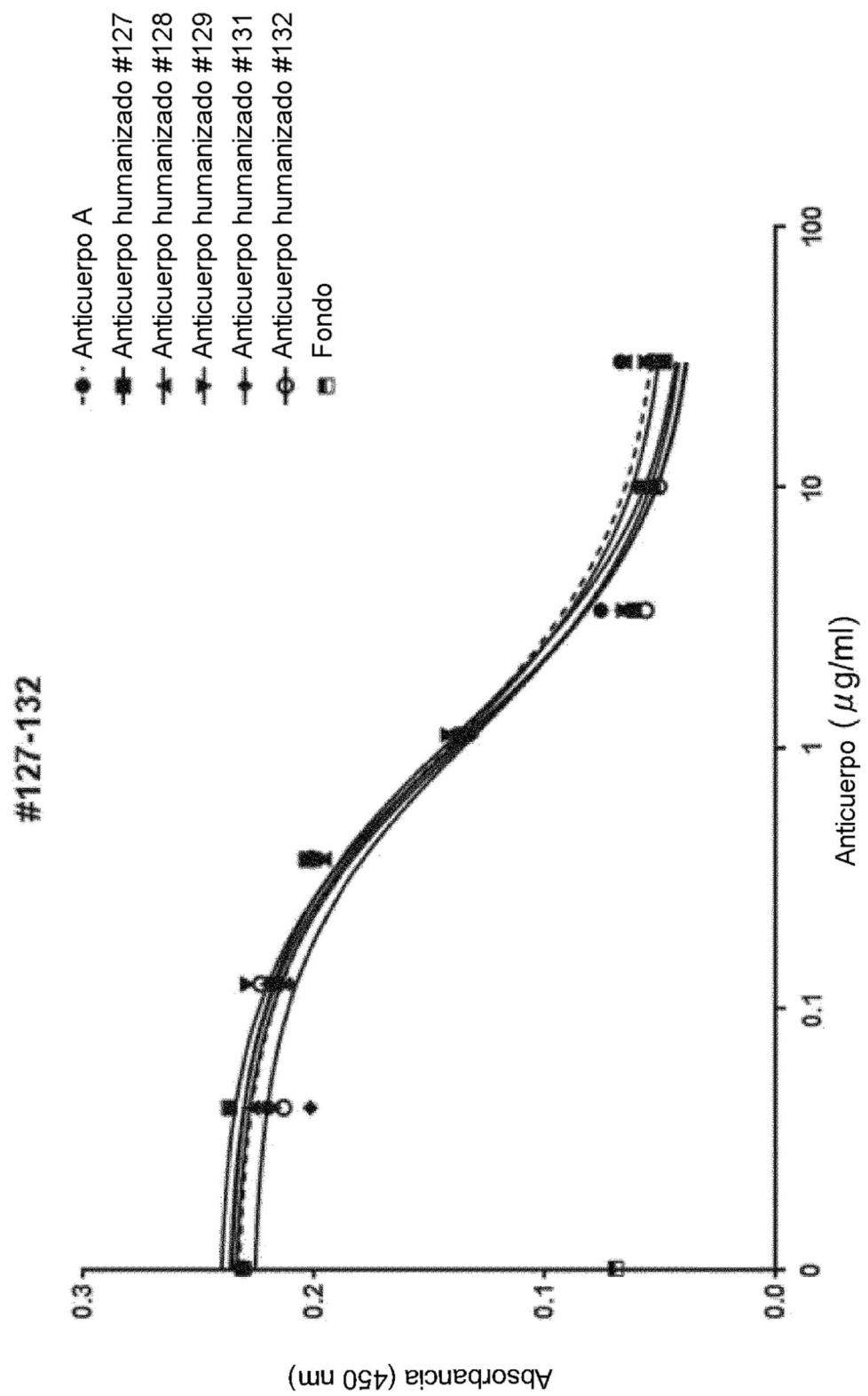
**Fig.13-2**



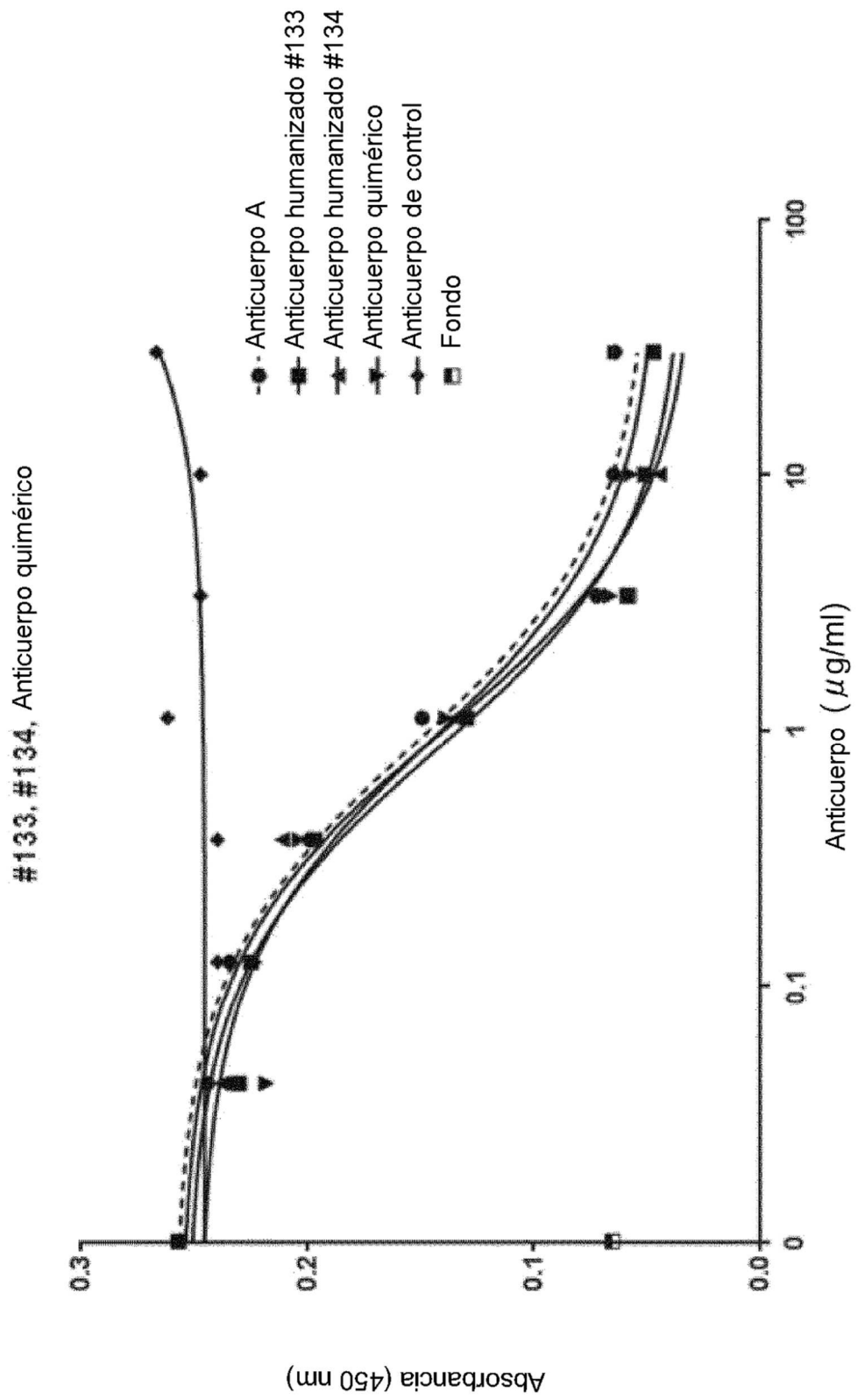
**Fig.13-3**



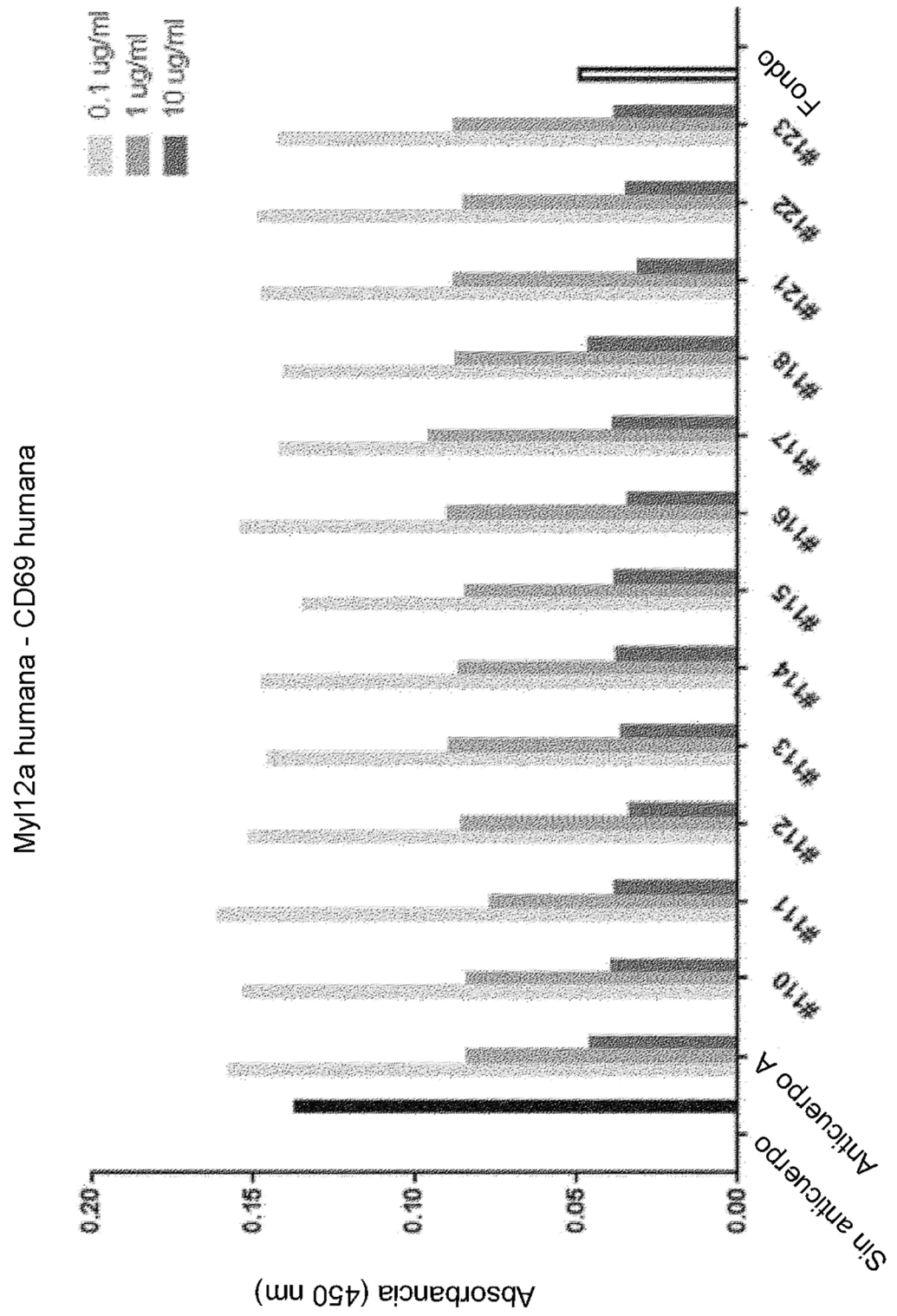
**Fig.13-4**



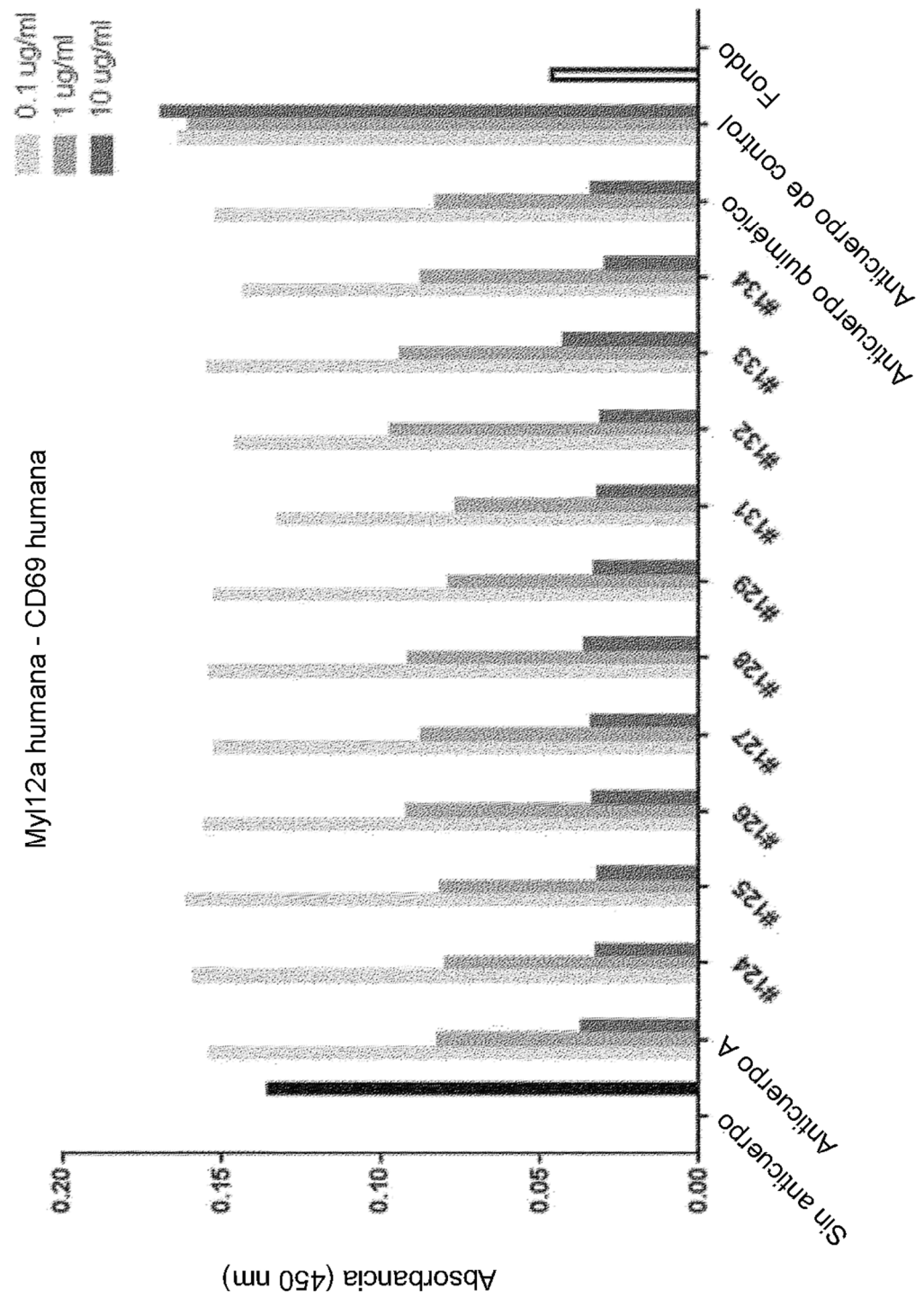
**Fig.13-5**



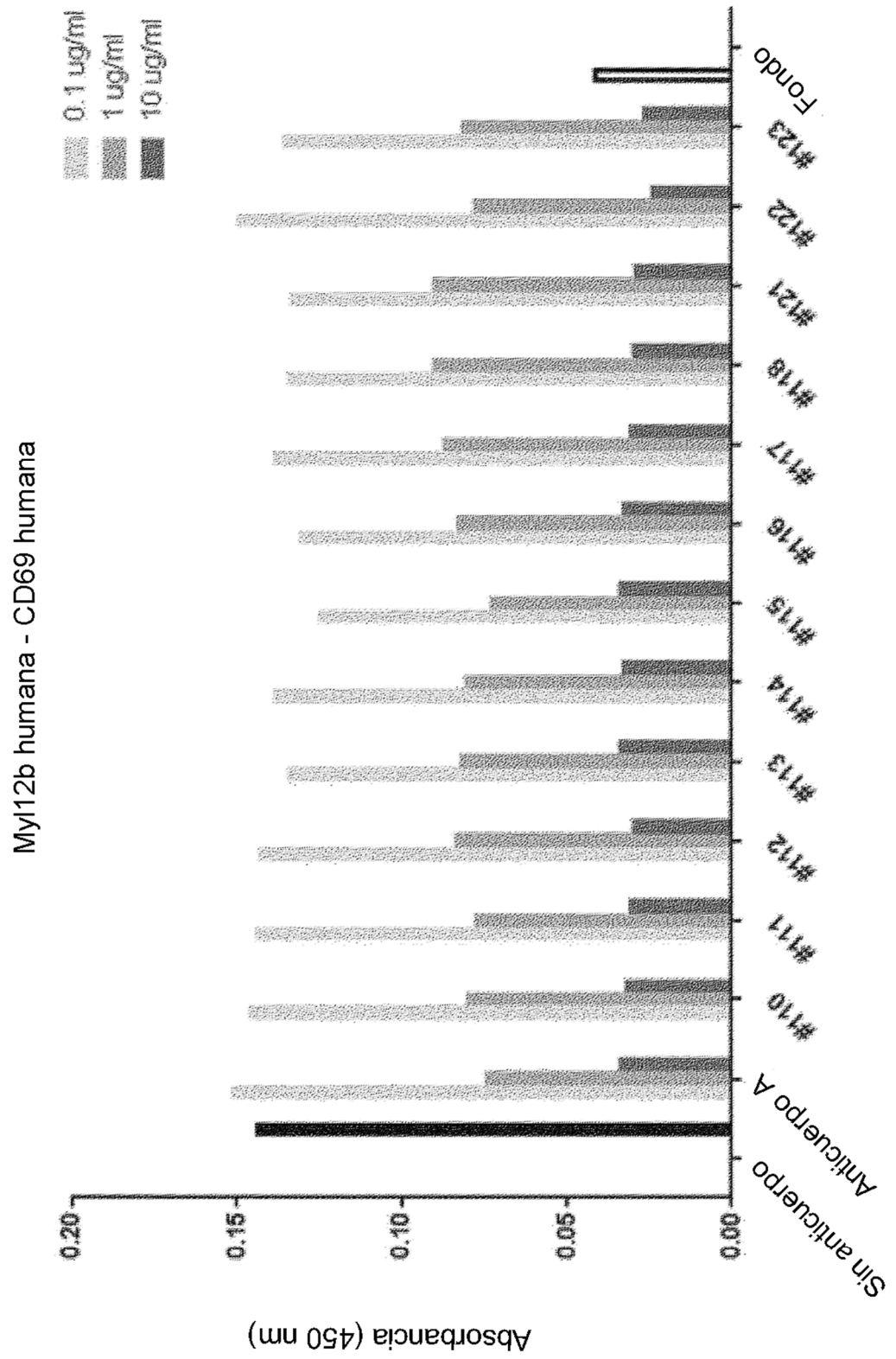
**Fig. 14-1**



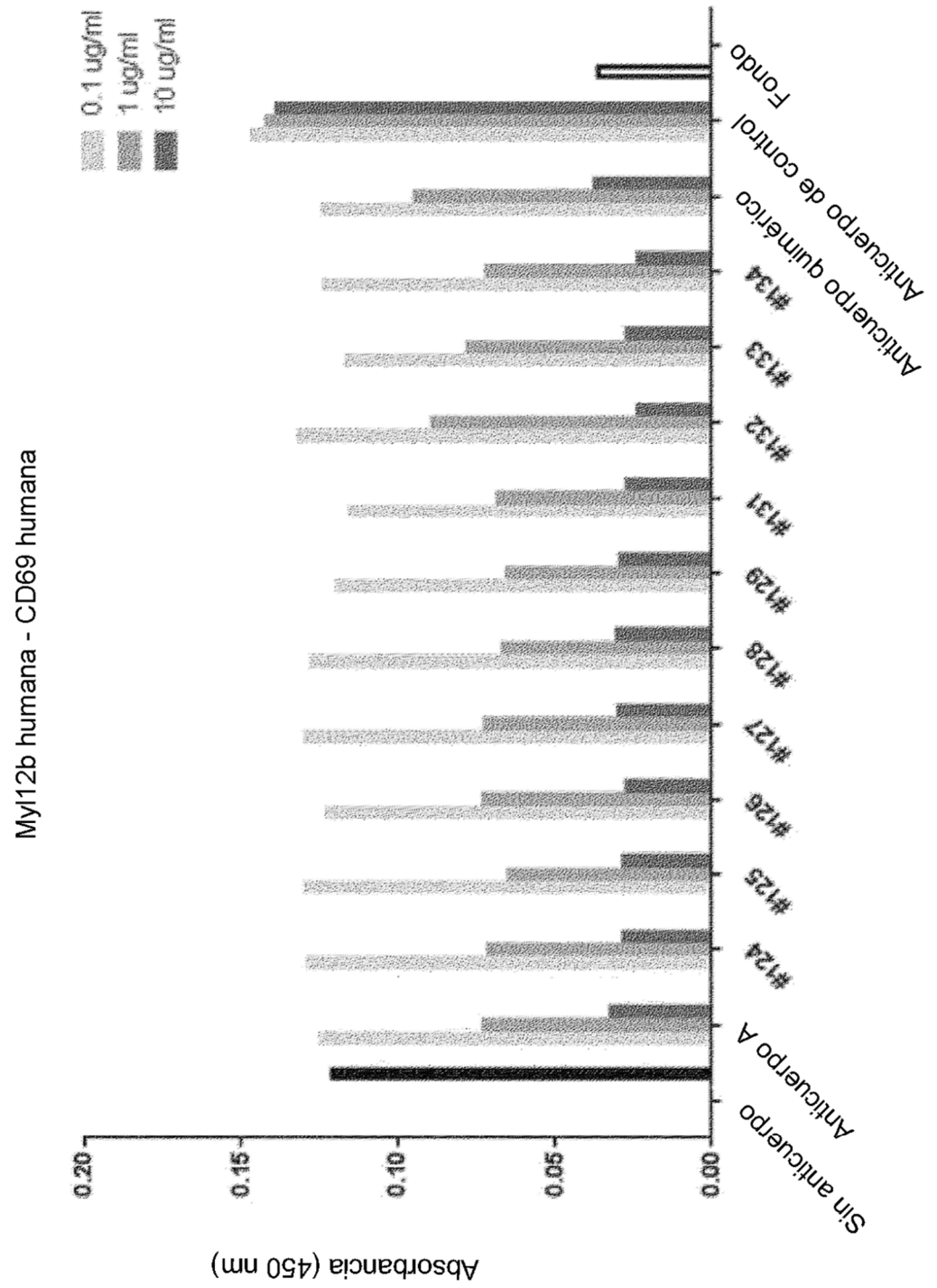
**Fig.14-2**



**Fig.14-3**



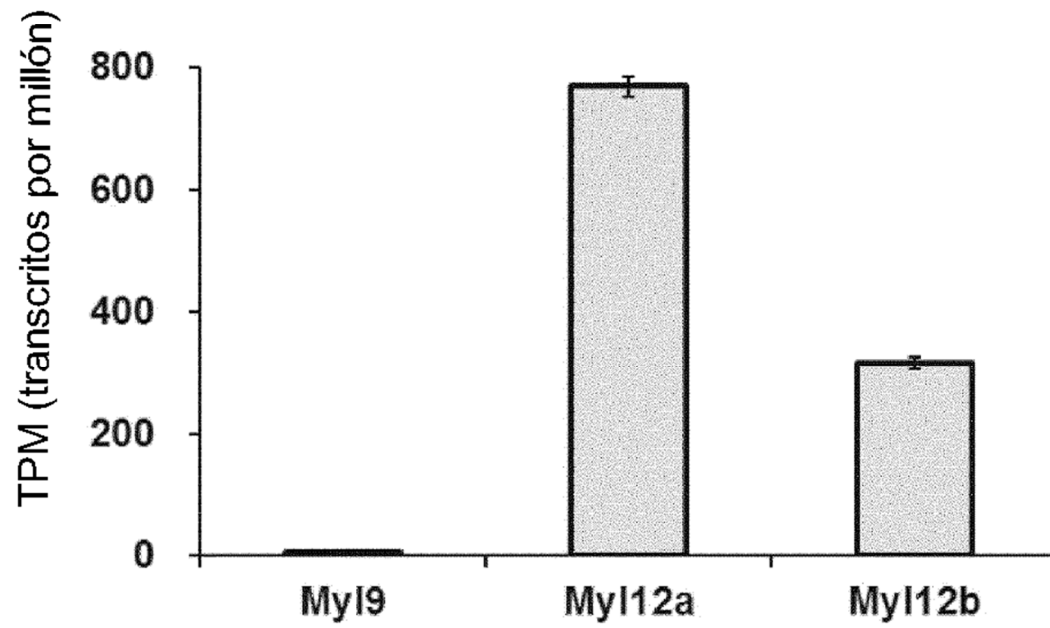
**Fig.14-4**





**Fig.15**

Expresión de los genes Myl9, Myl12a  
y Myl12b en tumor CT26.WT



**Fig.16**