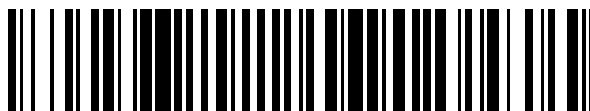


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 431**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2004** **E 04759921 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012** **EP 1613660**

54 Título: **Composiciones y métodos relacionados con STOP-1**

30 Prioridad:

16.04.2003 US 463656 P

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

19.04.2013

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

ACKERLY, HEIDI;

ASHKENAZI, AVI;

EBERHARD, DAVID;

FRANTZ, GRETCHEN;

FRENCH, DOROTHY;

FUH, GERMAINE;

HONGO, JO-ANNE;

LEE, CHINGWEI;

MARSTERS, SCOT;

PITTI, ROBERT;

RAAB, HELGA;

SOROCEANU, LILIANA;

VARFOLOMEEV, EVGENY y

WOLF, BENI

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 401 431 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

Composiciones y métodos relacionados con STOP-1.

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos STOP-1, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico, antagonistas, agonistas, potenciadores y composiciones relacionadas con STOP-1, y métodos de fabricación y utilización de los mismos, que incluyen métodos para el diagnóstico y el tratamiento de tumores en mamíferos. La presente invención se refiere además al diagnóstico y al tratamiento de trastornos que implican angiogénesis y vasculogénesis (por ejemplo, trastornos cardiovasculares, así como oncológicos).

ANTECEDENTES E INTRODUCCIÓN DE LA INVENCION

[0002] El crecimiento celular incontrolado es la causa de muchas enfermedades en una variedad de tipos de células. Por ejemplo, el cáncer aparece cuando existe un incremento en el número de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral. Las células tumorales invaden a menudo los tejidos adyacentes y se pueden extender a través del sistema sanguíneo o linfático a nódulos linfáticos regionales y a sitios distantes a través de un proceso denominado metástasis. En un crecimiento canceroso, una célula prolifera bajo condiciones en que las células normales no crecerían. El cáncer se manifiesta en una amplia variedad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasividad y agresividad. Los tumores malignos (cánceres) son la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos, después del ataque al corazón (Boring et al., CA Cancer J. Clin. 43:7 (1993)).

[0003] Se ha dedicado mucha investigación a descubrir nuevos tratamientos para trastornos proliferativos celulares, tales como el cáncer. A pesar de los avances recientes, existe una gran necesidad por identificar y entender el papel de nuevas dianas celulares para la modulación de la proliferación celular y para desarrollar métodos alternativos o más eficaces de tratamiento y agentes terapéuticos y de diagnóstico. También existe la necesidad de desarrollar agentes terapéuticos alternativos y métodos para el tratamiento de tipos de células específicas y para el tratamiento de enfermedades causadas por o asociadas con la proliferación anormal de células, tales como los cánceres. Por ejemplo, la desmoplasia es la hiperplasia de fibroblastos y la formación desproporcionada de tejido conectivo fibroso, especialmente en el estroma de carcinomas. La desmoplasia es el sello distintivo de la invasión tumoral y la malignidad. Los tumores desmoides y los fibroides abdominales son nódulos o masas relativamente grandes de tejido conectivo de tipo cicatriz inhabitualmente firme resultante de la proliferación activa de fibroblastos, que tiene lugar más frecuentemente en los músculos abdominales de mujeres que han tenido niños; los fibroblastos se infiltran alrededor del músculo y la fascia.

[0004] En la vida postnatal, la vasculogénesis (células endoteliales que forman una red tubular primaria) y la angiogénesis (el crecimiento o rebrote de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes) juegan papeles críticos en la patofisiología del trastorno neoplásico (Semenza, G.L., (2003) Ann. Rev. Med. 54:17-28). La distinción entre vasculogénesis y angiogénesis no es absoluta y se solapan (Ribatti, D et al., (2001) Mech.Dev. 100:157-163). Ambos requieren la proliferación de células endoteliales, migración, reorganización tridimensional de nuevos agregados formados y utilizan mecanismos adhesivos de matrices extracelulares similares (Ribatti, supra). Se ha observado que la utilización de terapias antiangiogénicas, tales como el anticuerpo contra el crecimiento endotelial vascular (VEGF) denominado Avastin, es útil en el tratamiento de cánceres.

[0005] Otra proteína celular, referida aquí como STOP-1 o UNQ762, se ha observado que se sobreexpresa en ciertos tumores (por ejemplo, WO 01/163318, WO 01/68848, WO 02/00690, WO 02/08284, WO 02/16602, WO 02/42487, WO 02/071928). Se han descrito anticuerpos policlonales contra STOP-1 (por ejemplo, WO 02/42487). Aunque ha habido cierta discusión sobre el reconocimiento de STOP-1 para tratar cánceres y enfermedades asociadas con la angiogénesis (por ejemplo, WO 01/163318, WO 01/68848, WO 02/00690, WO 02/08284, WO 02/16602, WO 02/42487, WO 00/71581, WO 02/00690), existe la necesidad de explorar adicionalmente la biología de la proteína STOP-1 para identificar agentes terapéuticos alternativos y más eficaces y métodos para el diagnóstico y el tratamiento del crecimiento celular no controlado y enfermedades causadas por, asociadas con o complicadas por angiogénesis excesiva e insuficiente.

[0006] La presente invención vadirigida a estas necesidades y otras mediante la disposición de nuevos polipéptidos STOP-1, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico, composiciones y métodos que incorporan conocimiento adicional sobre la proteína STOP-1. Entre otras cosas, la presente memoria muestra que el STOP-1 se sobreexpresan en el estroma de varios tipos de tumores. La presente memoria muestra que la sobreexpresión de STOP-1 solo puede ser tumorigénico. Además, la presente memoria demuestra que la proteína STOP-1 se puede secretar y que la secreción es necesaria para la tumorigénesis. Además, la presente memoria muestra que el estado de glicosilación de STOP-1 afecta si se secreta y que la eliminación de un sitio de N-glicosilación, por ejemplo, mediante la sustitución del aminoácido en la posición 186 (Asn) por alanina da lugar a una pérdida de secreción. La presente memoria muestra que el enlace disulfuro entre las proteínas STOP-1 puede tener lugar en una cisteína 55 en el cultivo en el dominio de triple hélice de STOP-1. Adicionalmente, la presente memoria muestra que la proteína STOP-1 puede formar un complejo con sí mismo

como dímero, trímero y hexámero y que el extremo C-terminal de la proteína es suficiente para la oligomerización, mientras que no es necesaria una región relacionada con el dominio de triple hélice de colágeno. La presente memoria también muestra una pluralidad de agentes que se unen específicamente a STOP-1, que incluyen la región C-terminal y región N-terminal de la proteína, así como secuencias de ácido nucleico y proteínas que las codifican. Además, la presente memoria muestra que la expresión de STOP-1 se puede modular por la sobreexpresión de proteínas en el mecanismo de señalización de WNT que es conocida por causar el cáncer de mama en ratones, por ejemplo, la sobreexpresión de WNT. Adicionalmente, la presente memoria muestra que el STOP-1 se puede dividir por proteasas que se sobreexpresan en los mismos tumores que STOP-1, por ejemplo, MMP-9. Además, la presente memoria muestra que un método para producir polipéptidos STOP-1 mediante la expresión de los polipéptidos en líneas celulares deficientes en la síntesis de proteoglicanos. La presente memoria muestra que el STOP-1 se une a la superficie de células, tales como células del cáncer y células endoteliales. La presente memoria muestra moléculas antagonistas que pueden inhibir la interacción de STOP-1 con la superficie de las células. La presente memoria muestra moléculas que pueden potenciar la unión de STOP-1 con la superficie de células. La presente memoria también se refiere al papel de STOP-1 en la angiogénesis y vasculogénesis y métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos para cuyo tratamiento se mejoraría mediante la modulación de la angiogénesis y la vasculogénesis. Estos datos y otros proporcionados aquí, junto con otra descripción en la presente solicitud, enseñan métodos nuevos, mejores y/o alternativos para utilizar la proteína STOP-1 o composiciones relacionadas con la misma.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0007] La presente invención proporciona nuevos agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y métodos para el tratamiento y prevención de la proliferación celular no controlada, incluyendo cáncer y otras enfermedades, mediante el marcaje de la actividad, expresión y regulación de STOP-1 tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona nuevos agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y métodos para el tratamiento de cualquier enfermedad médica que tiene sucesos angiogénicos o vasculogénicos en exceso o inapropiados, subóptimos, mediante el marcaje de la actividad, expresión y regulación de STOP-1 tal como se define en las reivindicaciones.

[0008] Según una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a los aminoácidos 33-53 o 33-52 de STOP-1 humano, y un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a los aminoácidos 94-243 de STOP-1 humano, tal como se define en las reivindicaciones. El STOP-1 humano es muestra en la figura 2, por ejemplo, Según una realización adicional, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a los residuos 94-243 de STOP-1 humano o los residuos 33-53 ó 33-52 de STOP-1 humano también reconoce una forma oligomérica de STOP-1 humano, tal como la forma trimérica. Se puede aislar un anticuerpo según la presente invención. Se entiende que un anticuerpo mencionado anteriormente que se une específicamente a un residuo en los residuos 33-52 ó 33-53 de STOP-1 humano también se puede unir a otros residuos en STOP-1 o equivalentes no humanos del mismo.

[0009] En otra realización, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que tienen las características biológicas de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en S7 codificado por la molécula de ácido nucleico depositado el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-5090, S4 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo del 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC con número de acceso PTA-5086, S9 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-5087, S16 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-5089, F5 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo del 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-5088 y 6B12 producido por la línea celular de hibridoma 6812.1.7 depositada el 28 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-5104, incluyendo los anticuerpos depositados, los anticuerpos que comprenden una parte de aquellos anticuerpos y variantes de los mismos tal como se definen en las reivindicaciones. En otra realización, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a STOP-1 humano, en la que la unión de los anticuerpos a STOP-1 se puede inhibir (por ejemplo, tal como se observa en un ensayo ELISA competitivo) por un segundo anticuerpo monoclonal seleccionado de uno de los anticuerpos depositados mencionados anteriormente tal como se define en las reivindicaciones.

[0010] La presente invención también se refiere a anticuerpos que tienen las siguientes secuencias:

Un anticuerpo monoclonal que comprende:

(a) una primera de secuencia de aminoácidos que comprende:

T-I-X1-X2-X3-X4

en la que X1 es S, N o T;

en la que X2 es G, N, S o A;

en la que X3 es Y, S o T; y

en la que X4 es D o W.

(b) una segunda de secuencia de aminoácidos que comprende:

X1-X2-I-X3-P-X4-XS-G-X6-T-X7 (SEQ ID NO: 115)

5 en la que X1 es G o A;

en la que

(1) X2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, T, A, y X3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, W y Y; o

10 (2) X3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, T, A, y X2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, W y Y;

en la que X4 es Y o F;

en la que X5 es G, S, T o A;

en la que X6 es N, Y o A; y

en la que X7 es N, Y o D; y

15 (c) una tercera de secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia:

C-X1-X2-X3-G-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11 (SEQ ID NO:116)

en la que X1 es A, S o T;

en la que X2 es un aminoácido básico;

en la que X3 es cualquier aminoácido;

20 en la que X4 es un aminoácido hidrófobo;

en la que cualquiera de X5- X8 puede ser cualquier aminoácido o puede estar ausente, y por lo menos uno de X5-X8 es un aminoácido aromático o un aminoácido hidrófobo;

en la que X9 es un aminoácido aromático o un un aminoácido hidrófobo;

en la que X10 es D o A; y

25 en la que X11 es Y o V.

[0011] Según una realización, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de cadena pesada de la figura 34. Según otra realización, el anticuerpo monoclonal es una IgG de longitud completa.

30 [0012] Según una realización de la presente invención, el X1 de la primera secuencia de aminoácidos es S. Según otra realización de la presente invención, el X2 de la primera secuencia de aminoácidos es G. Según otra realización de la presente invención, X3 de la primera secuencia de aminoácidos es S. Según una realización, la primera secuencia de aminoácidos es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en TISGSD (SEQ ID NO:8), TITNSD (SEQ ID NO:11) y TISGSW (SEQ ID NO:17).

35 [0013] Según otra realización de la presente invención, X3 de SEQ ID NO:115 es S o A. Según otra realización de la presente invención, X4 de SEQ ID NO: 115 es Y. Según otra realización de la presente invención, X5 de SEQ ID NO:115 es G o A. Según otra realización de la presente invención, X6 de SEQ ID NO:115 es N o A. Según una realización, SEQ ID NO:115 es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GRISPYGGNTN (SEQ ID NO:9), ATTPYGGYTY (SEQ ID NO:12) y A WIAPYSGATD (SEQ ID NO:18).

40 [0014] Según una realización de la presente invención, el X1 de SEQ ID NO: 116 es A. Según otra realización de la presente invención, el X2 de SEQ ID NO:116 es R. Según otra realización de la presente invención, X4 de SEQ ID NO:116 es L o M. Según una realización preferida de la presente invención, el aminoácido aromático presente en X5-X8 es un residuo de triptófano. Según otra realización, un aminoácido de X5-X8 está ausente. Según otra realización de la presente invención, X9 de SEQ ID NO:116 es F. Según una realización de la presente invención, X10 de SEQ ID NO:116 es D. Según una realización de la presente invención, X11 de SEQ ID NO:116 es Y. Según una realización, la SEQ ID NO: 116 es una secuencia seleccionada del grupo que

consiste en CARVGGLKLLFDY (SEQ ID NO:10), CARGGGMDGYVMDY (SEQ ID NO:13) y CAREGGLYWVFDY (SEQ ID NO:19).

[0015] Un anticuerpo según la presente invención puede comprender (a) una primera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia TISGSD (SEQ ID NO:8); (b) una segunda secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia GRISPYGGNTN (SEQ ID NO: 9); y (c) una tercera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia CARVGGLKLLFDY (SEQ ID NO:10), o una variante de dicho anticuerpo. Alternativamente, un anticuerpo según la presente invención puede comprender (a) una primera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia TITNSD (SEQ ID NO:11); (b) una segunda secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia ATIYPYGGYTY (SEQ ID NO:12); y (c) una tercera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia CARGGGMDGYVMDY (SEQ ID NO:13); o una variante de dicho anticuerpo. Alternativamente, un anticuerpo según la presente invención puede comprender (a) una primera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia TISGSW (SEQ ID NO:17); (b) una segunda secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia AWIAPYSGATD (SEQ ID NO: 8); y (c) una tercera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia CAREGGLYWVFD (SEQ ID NO:19); o una variante de dicho anticuerpo. Alternativamente, un anticuerpo según la presente invención puede comprender (a) una primera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia TISNYG (SEQ ID NO:20); (b) una segunda secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia GRISPSNGSTY (SEQ ID NO:21); y (c) una tercera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia CAKCSVRFAY (SEQ ID NO:22); o una variante de dicho anticuerpo. Alternativamente, un anticuerpo según la presente invención puede comprender (a) una primera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia TINNYD (SEQ ID NO:14); (b) una segunda secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia GYISPPSGATY (SEQ ID NO:15); y (c) una tercera secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia CARMVGMRRGVMDY (SEQ ID NO:16); o una variante de dicho anticuerpo.

[0016] En una realización adicional, la primera, segunda y tercera secuencias de aminoácidos descritas anteriormente se localizan en una cadena pesada humana en la que la primera secuencia de aminoácidos está en los residuos 28-33 de la cadena pesada según el sistema de numeración Kabat, la segunda secuencia de aminoácidos está en los residuos 49- de la cadena pesada según el sistema de numeración Kabat y la tercera secuencia de aminoácidos está en los residuos 92-102 según el sistema de numeración Kabat.

[0017] En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácidos de: (a) la secuencia de cadena pesada de la figura 27; (b) la secuencia de cadena pesada de la figura 28; (c) la secuencia de cadena pesada de la figura 29; (d) la secuencia de cadena pesada de la figura 30; (e) la secuencia de cadena pesada de la figura 31; o (f) la secuencia de cadena pesada de la figura 34; o variantes de las mismas. En una realización adicional, los anticuerpos de la presente invención comprenden además (a) la secuencia de la cadena ligera de la figura 27, (b) la secuencia de la cadena ligera de la figura 34; o variantes de las mismas.

[0018] En una realización adicional, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos quiméricos o humanizados. En otra realización, los anticuerpos de la presente invención son fragmentos de anticuerpos. En otra realización de la presente invención, los anticuerpos se conjugan a un agente seleccionado del grupo que consisten un agente de reconocimiento estromal, un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico, un agente de detección, un agente que mejora la biodisponibilidad y un agente que mejora la vida media del anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo multispecifico que tiene una especificidad de unión para un polipéptido STOP-1 y una o más especificidades de unión para cualquier otro antígeno. El otro antígeno puede ser una proteína de la superficie celular o receptor o subunidad del receptor. Según un ejemplo preferido, la proteína de la superficie celular es un receptor de células asesinas naturales (NK). Según un ejemplo más preferido, la unión del anticuerpo al receptor de NK activa la célula asesina natural.

[0019] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos y variantes de los mismos, vectores que comprende moléculas de ácido nucleico y células huésped que comprenden moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

[0020] La presente invención incluye composiciones que comprende un anticuerpo o una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Según una realización, la composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la composición comprende un agente de reconocimiento estromal. En una realización adicional, el agente de reconocimiento estromal está unido covalentemente al anticuerpo monoclonal o polipéptido. En una realización adicional, el agente de reconocimiento estromal reconoce una célula estromal de un tumor.

[0021] La presente invención proporciona métodos para producir un polipéptido STOP-1 o un anticuerpo anti-STOP-1 de la presente invención mediante el cultivo de una célula que comprende un ácido nucleico según la presente invención. Según una realización, el método para producir un polipéptido STOP-1 comprende la etapa de cultivar una célula de mamífero que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido STOP-1 y que es deficiente en la síntesis de proteoglicanos. Según otra realización, la línea celular que es deficiente en la síntesis de proteoglicanos es deficiente en la actividad de galactosiltransferasa I. Según una realización preferida, la línea celular es la línea celular CHO-psbg.

[0022] La presente invención proporciona un método para determinar la presencia de un polipéptido STOP-1 en una muestra que comprende exponer una muestra sospechosa de contener el polipéptido STOP-1 a un anticuerpo anti-STOP-1 y determinar la unión de dicho anticuerpo a un componente de dicha muestra, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de la invención, tal como se define en las reivindicaciones.

[0023] La presente invención proporciona métodos para el diagnóstico o la monitorización de un trastorno proliferativo celular, tal como un tumor, de un paciente que comprende la etapa de comparar la expresión de STOP-1 en un tejido normal con la cantidad de STOP-1 de análisis del paciente, donde una proteína STOP-1 se detecta por un agente que es un anticuerpo de la invención tal como se define en las reivindicaciones. En otra realización, el ARNm de STOP-1 se puede detectar por un agente, tal como una molécula de ácido nucleico que se hibrida específicamente al ARNm de UNQ6762. En una realización adicional, el tumor que se analiza tiene un compartimento estromal grande. En una realización adicional, el agente de detección STOP-1 se administra en o próximo al compartimento estromal del tejido que se analiza. En otra realización, el método comprende además la etapa de observar o ensayar la proteína de STOP-1 o ARNm en el agente del compartimento estromal del tejido normal y el tejido de análisis. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de la presente invención.

[0024] Se describe aquí el uso médico de un anticuerpo o composición de la invención en un método de prevención o tratamiento de un trastorno proliferativo en un paciente que comprende la etapa de administrar al paciente un anticuerpo o una composición de la presente invención en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación de células en el paciente. En una realización, el trastorno proliferativo es desmoplasia. La presente invención también proporciona dicho uso médico en un método de prevención o inhibición del crecimiento de un tumor que sobreexpresa STOP-1 en un paciente que comprende administrar al paciente un anticuerpo o una composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento del tumor en el paciente tal como se define en las reivindicaciones. En una realización adicional, el tumor a analizar tiene compartimentos estromales. En una realización adicional, el tumor que tiene compartimentos estromales se selecciona del grupo que consiste tumores desmoides, cáncer pancreático, sarcomas (por ejemplo, hemangiosarcoma, rabdomiosarcoma) y adenocarcinomas (adenocarcinomas mamarios, adenocarcinomas de colon, adenocarcinomas gastrointestinales y adenocarcinomas de ovario), carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, glioma, cáncer endometrial, cáncer vascular. En una realización adicional, el anticuerpo o composición se administra en o próximos a un estroma del tumor. En otra realización, el tumor es un melanoma o un tumor de célula redonda (por ejemplo, histiocitoma fibroso maligno).

[0025] Un antagonista según el presente documento es cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcialmente o totalmente una actividad biológica de un polipéptido STOP-1 nativo y que se une específicamente a un polipéptido STOP-1 nativo, en el que la unión de la molécula antagonista (1) a un polipéptido STOP-1 nativo en forma oligomérica, (2) es a los residuos 94-243 de STOP-1 humano nativo y/o (3) se puede inhibir (por ejemplo, tal como se observa en un ensayo ELISA competitivo utilizando STOP-1 y 6B12) por un anticuerpo monoclonal de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo depositado de la presente invención, etc.). Según una realización, el anticuerpo depositado es el anticuerpo 6B12. El antagonista puede ser un polipéptido. Según una realización, el antagonista es un anticuerpo de la presente invención. El polipéptido STOP-1 que el antagonista inhibe puede ser parte de un complejo trimérico.

[0026] La actividad biológica que es inhibida por el antagonista puede ser la interacción de STOP-1 con una célula que se une específicamente a STOP-1. La célula puede ser una célula de cáncer de mama o una célula endotelial. El antagonista puede tener una propiedad adicional seleccionada del grupo que consiste en (1) capaz de unirse a un epítipo en STOP-1 humano al que se une el anticuerpo 6B12; (2) capaz de unirse a un residuo en por lo menos residuos 33-52 de STOP-1 humano; y (3) capaz de ser responsable de la unión a STOP-1 por el anticuerpo 6B12 (por ejemplo, tal como se observa en un ensayo ELISA competitivo utilizando STOP-1, el antagonista y el anticuerpo 6B12).

[0027] Se describe aquí un método para inhibir el crecimiento de una célula que sobreexpresa STOP-1 que comprende la etapa de inhibir la secreción de STOP-1 de la célula. La secreción se puede inhibir mediante la inhibición de la glicosilación de STOP-1 o mediante la sobreexpresión de una proteína STOP-1 que no puede ser secretada en la célula, o mediante una proteína STOP-1 que está mutada en el residuo 186.

[0028] Se describe aquí un método para prevenir una unión disulfuro entre moléculas STOP-1 que comprenden una etapa seleccionada del grupo que consiste en: (1) mutar moléculas de ADN que codifican STOP-1 en el residuo cisteína 55; (2) expresar proteínas STOP-1 que están mutadas en el residuo cisteína 55 en presencia de proteínas STOP-1 naturales; y (3) incubar proteínas STOP-1 que están mutadas en el residuo cisteína 55 con proteínas STOP-1 naturales.

[0029] Se describe aquí un método para separar STOP-1 que comprende la etapa de incubar STOP-1 con una proteasa seleccionada del grupo que consiste en una matriz metaloproteasa-7 (MMP-7) y una matriz metaloproteasa-9 (MMP-9). El método puede comprender adicionalmente la etapa de monitorizar los productos de separación de STOP-1 producidos.

[0030] Otra realización de la presente invención se refiere al uso médico de un antagonista de STOP-1 en un método para inhibir el crecimiento de una célula que sobreexpresa un polipéptido STOP-1, en el que el método comprende administrar un antagonista de STOP-1, en el que el antagonista es un anticuerpo de la invención y está opcionalmente conjugado a uno o una combinación de agentes seleccionados del grupo que consiste en un agente de reconocimiento estromal, un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico, tal como una toxina, que incluyen, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica. También se describe aquí un método para la inhibición del crecimiento de una célula que sobreexpresa un polipéptido STOP-1, en el que el método comprende administrar un agente a una célula estromal del tumor, en el que el agente es un antagonista de STOP-1 o una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido STOP-1. El agente puede administrarse a la célula estromal directamente por un paciente o un médico o indirectamente, a través de la utilización de agentes de reconocimiento estromal que pueden dirigir el agente a la célula estromal. La presente invención proporciona un artículo de fabricación que comprende (A) una composición de materia que comprende un antagonista de STOP-1 o un potenciador de STOP-1; (b) un recipiente que contiene dicha composición; y (c) una etiqueta fijada a dicho recipiente, o un prospecto incluido en dicho recipiente que se refiere a la utilización de dicha composición en el tratamiento de un trastorno proliferativo o una enfermedad asociada con angiogénesis o vasculogénesis anormal (por ejemplo, un prospecto), en el que el antagonista o potenciador de STOP-1 es un anticuerpo de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

[0031] Se describen aquí métodos para analizar la actividad de STOP-1 y agonistas o antagonistas de STOP-1. En un ejemplo, se describe un método de inducir la migración celular in vitro que comprende administrar a una célula endotelial un polipéptido STOP-1 en una cantidad eficaz para inducir la migración de dicha célula. Según otro ejemplo, se describe un método de análisis de la actividad de un antagonista o agonista candidato de STOP-1 que comprende las etapas de tratar una primera célula endotelial con STOP-1, tratar una segunda célula endotelial con STOP-1 y el antagonista o agonista candidato, y comparar la migración de las primeras y segundas células endoteliales. En un ejemplo preferido, la célula utilizada en dicho ensayo de migración es una célula HUVEC.

[0032] También se describen aquí métodos de tratamiento de una enfermedad o condición asociadas con una angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada en un sujeto mamífero. En un ejemplo, el método comprende la etapa de administrar al sujeto un antagonista de STOP-1 en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad, en la que el antagonista de STOP-1 tiene alguna propiedad seleccionada del grupo que consiste en (1) se une a residuos en STOP-1 humano al que se une el anticuerpo 6B12; (2) se une a un residuo en por lo menos los residuos 33-52 de STOP-1 humano; y (3) se puede inhibir de la unión a STOP-1 por el anticuerpo 6B12.

[0033] La presente invención también contempla el tratamiento de pacientes que se beneficiarían de una vasculogénesis o angiogénesis incrementada mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un potenciador de STOP-1, una molécula que aumenta la unión de STOP-1 a células y/o agrega STOP-1 en la superficie celular, tal como se define en las reivindicaciones. Dicha molécula se administraría en una cantidad eficaz para incrementar la angiogénesis o vasculogénesis, y en la que el agonista es un anticuerpo anti-STOP-1 que agrega STOP-1 a una superficie celular.

[0034] Se describen aquí nuevos métodos para identificar y evaluar antagonistas, agonistas y potenciadores de STOP-1 candidatos y conocidos, que comprenden la etapa de observar o medir la unión de STOP-1 a una célula en presencia y ausencia del antagonista, agonista o potenciador. La célula puede ser una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de cáncer de mama. Según otro ejemplo, la célula es una célula endotelial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0035]

La figura 1 muestra una alineación de secuencias de aminoácidos que codifican STOP-1 de una amplia variedad de especies humana (SEQ ID NO:3), ratón (SEQ ID NO:4), pez del arroz (SEQ ID NO:5), pez cebra (SEQ ID NO:6) y pollo (SEQ ID NO:7). También se proporciona una secuencia consenso. La flecha indica un sitio de separación de la secuencia señal. El color rojo indica residuos conservados en todas las especies. Las letras en mayúscula en la secuencia consenso indica residuos que se han conservado en todas las especies. Las letras en minúscula en la secuencia consenso indican residuos que se conservan en la mayoría de especies. Los residuos que no se conservan en estas especies aparecen como un "periodo". "!" indica I o V. "\$" indica L o M. "%" indica F o Y. "#" indica B, D, E, N, Q o Z.

La figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos que codifica STOP-1 humano (SEQ ID NO:3). Una secuencia señal está indicado por los aminoácidos encuadrados. Un dominio de triple hélice se indica mediante subrayado. Un sitio de glicosilación está en el aminoácido 186.

La figura 3 muestra (A) la presencia de ARNm de STOP-1 humano en ciertos tipos de tejidos y (B) ARNm de STOP-1 de ratón de diferentes etapas de desarrollo del ratón. Los ADN de STOP-1 humano o ratón de longitud

completa se radiomarcaron y utilizaron para sondar transferencias northern de tejidos de humanos adultos o embriones de ratón en desarrollo.

La figura 4 muestra proteínas STOP-1 humanas teñidas con coomassie producidas por células (A) CHO-DP12 o (B) CHO-psgb (ATCC) y purificadas mediante cromatografía de afinidad de níquel-NTA. El vector, pRK5, se utilizó como control.

La figura 5 muestra una transferencia western de proteína STOP-1 humana etiquetada con histidina presente en el sobrenadante (A) y lisado celular (B) de células CHO-psgb transfectadas de forma transitoria. Las transferencias western se sondaron con anticuerpo anti-his.

La figura 6 muestra la oligomerización de proteína STOP-1 humana expresada utilizando un sistema infección bacuviral en células de insecto SF9. La proteína STOP-1 y varios mutantes por delección se expresaron a partir de células SF9, se separaron en una columna de exclusión de tamaño y se sometieron a análisis de dispersión de luz, por ejemplo, (A) S31-K243, (B) E89-K243 y (C) L94-K243. El peso molecular predicho de los monómeros aparece en la esquina izquierda de cada gráfico. Los números que aparecen al lado de varios picos se refieren al peso molecular promedio de los complejos en el pico.

La figura 7 muestra la oligomerización de la proteína STOP-1 humana expresada a partir de células de mamífero. La proteína STOP-1 humana y varios mutantes por delección se expresaron a partir de células CHO, se separaron en una columna de exclusión de tamaño y se sometieron a análisis de dispersión de luz, por ejemplo, (A) M1-K243 y (B) delta-THD (residuos 1-54, 94-243, más la etiqueta de histidina). El peso molecular predicho de los monómeros aparece en la esquina izquierda de cada gráfico. Los números que aparecen al lado de varios picos se refieren al peso molecular promedio de los complejos en los picos. Bajo condiciones no reductoras, las transferencias western de la proteína STOP-1 humana de longitud completa secretada etiquetada con his expresadas de células CHO-psgb presentaban predominantemente complejos homodimerizados (C). Las transferencias western se sondaron con anticuerpo anti-his.

La figura 8 muestra las transferencias western de (A) medio de cultivo celular y (B) lisados de células completas de células CHO-psgb que expresan STOP-1 WT humana etiquetada con his, STOP-1 delta-THD, y delta-delta-THD (residuos 1-51, 94-243, más etiqueta de histidina) y sometidas a condiciones reductoras y no reductoras. Las transferencias western se sondaron con anticuerpo anti-his.

La figura 9 muestra transferencias western de (A) medio de cultivo celular y (B) lisados de células completas de células CHO-psgb que expresan construcciones STOP-1 G53A y N186A WT etiquetadas con his y sometidas a condiciones reductoras o no reductoras. Las transferencias western se sondaron con anticuerpo anti-his.

La figura 10 muestra transferencias western de (A) medio de cultivo celular y (B) lisados de células completas de células CHO-psgb que expresan construcciones STOP-1 C55A, C93A y C109A WT etiquetadas con his y sometidas a condiciones reductoras o no reductoras. Las transferencias western se sondaron con anticuerpo anti-his.

La figura 11 muestra que el ARNm de STOP-1 murina (ARNm de mSTOP-1) se expresa en tumores de mama derivados de ratones transgénicos MMTV-WNT1, pero no en células epiteliales de mama normal. Las muestras de ARN se tomaron de células de tumores de mama (marcados "T1"- "T7") o células epiteliales de mama normal de ratón C57Mgs (marcado, "N"), se sometieron a RT-PCR con cebadores mSTOP-1 y cebadores mRLP19. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa.

La figura 12 muestra la proliferación de células 3T3 después de la transfección con (A) STOP-1 humana o (B) STOP-1 de ratón.

La figura 12A muestra la cantidad de incorporación de ³H-timidina (recuentos por minuto (cpm)) en células 3T3 a las 12, 28 y 96 horas después de la adición de ³H-timidina. La figura 12B muestra la cantidad de incorporación de ³H-timidina (recuentos por minuto (cpm)) en células 3T3 a las 12, 28 y 96 horas después de la adición de ³H-timidina. Controles: transfecciones con vector solo (puro2 y ph1).

La figura 13 muestra la proliferación de células 3T3 o 293 después de la infección con retrovirus que codifica STOP-1 humana. La figura 13A y B son transferencias western de proteínas STOP-1 humanas expresadas a partir de células 3T3 o 293, respectivamente, infectadas con un retrovirus que codificaba un vector de control (Babe) o STOP-1 humana. La STOP-1 se inmunoprecipitó a partir de lisados de células completas utilizando el anticuerpo S7-IgG. Las transferencias western se sondaron con anticuerpos policlonales anti-STOP-1 humana. La figura 13C muestra el nivel de proliferación celular observado para las poblaciones de células infectadas detectado mediante un ensayo de títulos celulares colorimétricos.

La figura 14 muestra que la STOP-1 de ratón promueve la tumorigénesis por fibroblastos 3T3 en un modelo de xenoinjerto de ratón. La figura 14A muestra el volumen promedio de tumores en ratones implantados con fibroblastos 3T3 transfectados con vector solo (vector p2) o ADN que codifica la proteína STOP-1 o RAS de ratón. Las células transfectadas se implantaron en ratones desnudos o se analizaron para la expresión de

proteína. La figura 14B y C muestra transferencias western de alícuotas de los sobrenadantes y lisados, respectivamente, de las células transfectadas. La transferencia western se sondó con anticuerpos policlonales anti-STOP-1 de conejo. "TI" se refiere a la proporción de incidentes en el tumor.

5 La figura 15 muestra que la STOP-1 humana promueve la tumorigénesis por fibroblastos 3T3 en un modelo de xenoinjerto de ratón. La figura 15 muestra el volumen promedio de tumores en ratones implantados con fibroblastos 3T3 transfectados con vector solo o ADN que codifica la proteína STOP-1, la proteína RAS o LP1 de humano. S7 tiene las SEQ ID NOS: 8-10. S16 tiene las SEQ ID NOS: 11-13. F5 tiene las SEQ ID NOS: 14-16. F13 y F47 tiene las SEQ ID NOS: 17-19. S9 tiene las SEQ ID NOS: 20-22.

10 La figura 16 muestra que la proteína STOP-1 recombinante potencia la curación de heridas y motilidad de células SK-Mel-31. Las células SK-Mel-31 se trataron con (A) NT-tratamiento con ligando no exógeno, (B) proteína STOP-1 humana producida por baculovirus b762, (C) hrEGF-(50 ng/ml), (D) hrEGF y b762 o (E) proteína STOP-1 humana producida por CHO de mamífero.

15 La figura 17 muestra que el anticuerpo anti-STOP-1 humano, 6B12, se une a la secuencia N-terminal de STOP-1 humana entre la secuencia señal y los dominios de triple hélice. La figura 17A es un esquema de las proteínas STOP-1 de pez cebra humanas etiquetadas con his y de longitud completa utilizadas en los estudios de localización de epítomos de las figuras 17B y C. Las figuras 17B y C muestran transferencias western sondadas con anticuerpo anti-his y anticuerpo 6B12, respectivamente, de extractos de células que expresan recombinantemente las proteínas de la figura 17A.

20 La figura 18 muestra las secuencias de aminoácidos de las CDR de varios anticuerpos derivados de fagos que tienen afinidad para la STOP-1 humana. "H1," "H2" y "H3" se refieren a VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3. El encabezamiento numérico corresponde en general a las posiciones de aminoácidos 28-33,49-58 y 92-102 según el sistema de numeración Kabat. Las SEQ ID NO para las secuencias listadas son las siguientes:

<u>H1</u>	<u>H2</u>	<u>H3</u>	<u>Nombre Ab</u>
<u>SEQ ID NO:8</u>	<u>SEQ ID NO:9</u>	<u>SEQ ID NO:10</u>	<u>S7</u>
<u>SEQ ID NO:11</u>	<u>SEQ ID NO:12</u>	<u>SEQ ID NO:13</u>	<u>S16</u>
<u>SEQ ID NO:14</u>	<u>SEQ ID NO:15</u>	<u>SEQ ID NO:16</u>	<u>F5, F6</u>
<u>SEQ ID NO:17</u>	<u>SEQ ID NO:18</u>	<u>SEQ ID NO:19</u>	<u>S4, F13, F37</u>
<u>SEQ ID NO:20</u>	<u>SEQ ID NO:21</u>	<u>SEQ ID NO:22</u>	<u>S9</u>

25 La figura 19 muestra un gráfico de un ensayo ELISA para determinar una concentración óptima de Fab o IgG S4 y S7 para utilizar en un ELISA de competición para determinar la afinidad de los anticuerpos para STOP-1. "S de recubrimiento" se refiere a una forma corta (#94-243) de STOP-1 de recubrimiento en una placa de microtitulación. "F de recubrimiento" se refiere a una forma de longitud completa de STOP-1 humana de recubrimiento en una placa de microtitulación. Se consideró que aproximadamente el 90% de la unión máxima era óptima para utilizar en un ensayo de ELISA competitivo. Se utilizó proteína G conjugada a peroxidasa de rábano picante para detectar el Fab e IgG unidos.

30 La figura 20 muestra un gráfico de los resultados de ELISA competitivo para determinar las afinidades de unión de las Fab o IgG S4 y S7. Las placas se recubrieron con STOP-1 humana de forma corta o longitud completa y compitieron con STOP-1 de forma corta o longitud completa, respetivamente (figuras 20A y B, respectivamente). Las afinidades de union calculadas se indicant en paréntesis.

35 La figura 21 muestra un resumen de las afinidades de unión de varios anticuerpos derivados de fagos contra STOP-1. "S/S" se refiere a un ELISA en que la placa de microtitulación se recubrió con una forma corta de STOP-1 y compitió con una forma corta de STOP-1. "F/S" se refiere a un ELISA en que la placa de

microtitulación se recubrió con una forma de longitud completa de STOP-1 humana y compitió con una forma corta de STOP-1 humana. "F/F" se refiere a un eLISA en que la placa de microtitulación se recubrió con una forma de longitud completa de STOP-1 y compitió con una forma de longitud completa de STOP-1. Los fagos utilizados en estos estudios fueron el fago S4-Fab y el fago S7-F(ab)₂.

5 La figura 22 muestra un gráfico de un ensayo ELISA en que las placas se recubrieron con STOP-1 humana, se unieron con IgG S4 y a continuación compitieron con fago (Fab) S4, fago (F(ab)₂) S7, fago (Fab) S9, fago (F(ab)₂) S16 y fago (F(ab)₂) F5. El eje Y se refiere al porcentaje no bloqueado calculado dividiendo el valor de DO450 nm del pocillo que bloqueaba IgG S4 por el valor de DO450 nm de un pocillo sin IgG S4.

10 La figura 23 muestra un gel teñido con coomassie de proteína STOP-1 humana expresada con baculovirus separada por varias proteasas in vitro. "MMP" se refiere a metaloproteasa de matriz.

Las figuras 24A-D son esquemas de fagémidos que codifican Fab de proteínas de expresión en fagos F(ab)₂ o vectores que codifican proteínas Fab o IgG. La figura 24A es un esquema de una construcción de fagémido de Fab. La construcción contiene un promotor de fosfatasa alcalina, una secuencia señal de STII, una secuencia de cadena ligera VL y CL, una etiqueta gD, otra secuencia señal de STII, una región de cadena pesada VH y CH1 y una parte C-terminal de la proteína de cubierta pIII del bacteriófago M13 (cP3). La figura 24B es un esquema de una construcción de fagémido de F(ab)₂. La construcción contiene en general las mismas secuencias que el fagémido de Fab, a excepción de que incluye adicionalmente una secuencia de cremallera de leucina (Zip). La figura 24C es un esquema de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína Fab. La figura 24D es un esquema de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína IgG, cuya proteína IgG incluye una secuencia CH2 y CH3.

20 Las figuras 25A-H describen secuencias de aminoácidos y una secuencia de ácido nucleico para Fab anti-Her-2 de expresión en fagos. Más específicamente, la figura 25 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de Fab anti-Her2 (SEQ ID NO:86), una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de Fab anti-Her2 (SEQ ID NO:87) y la secuencia de ácidos nucleicos de un fagémido que codifica las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO:88).

25 Las figuras 26A-H describen secuencias de aminoácidos y una secuencia de ácido nucleico para F(ab)₂ anti-Her-2 de expresión en fagos. Más específicamente, la figura 26 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de F(ab)₂ anti-Her2 (SEQ ID NO:89), una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de F(ab)₂ anti-Her2 (SEQ ID NO:90) y la secuencia de ácidos nucleicos de un fagémido que codifica las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO:91).

30 Las figuras 27A-C describen secuencias de aminoácidos y una secuencia de ácido nucleico para un S4-Fab de expresión en fagos. Más específicamente, la figura 27 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S4-Fab (SEQ ID NO:92), una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de S4-Fab (SEQ ID NO:93) y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO:94).

35 Las figuras 28A-C describen secuencias de aminoácidos y una secuencia de ácido nucleico para un S9-Fab de expresión en fagos. Más específicamente, la figura 28 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S9-Fab (SEQ ID NO:95), una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de S9-Fab (SEQ ID NO:96) y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO:97).

40 Las figuras 29A-C describen secuencias de aminoácidos y una secuencia de ácido nucleico para un S7- F(ab)₂ de expresión en fagos. Más específicamente, la figura 29 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S7- F(ab)₂ (SEQ ID NO:98), una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de S7- F(ab)₂ (SEQ ID NO:99) y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO:100).

45 Las figuras 30A-C describen secuencias de aminoácidos y una secuencia de ácido nucleico para un S16- F(ab)₂ de expresión en fagos. Más específicamente, la figura 30 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S16- F(ab)₂ (SEQ ID NO:101), una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de S16- F(ab)₂ (SEQ ID NO:102) y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO:103).

50 Las figuras 31A-C describen secuencias de aminoácidos y una secuencia de ácido nucleico para un F5- F(ab)₂ de expresión en fagos. La figura 31 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de F5-F(ab)₂ (SEQ ID NO:104), una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de F5-F(ab)₂ (SEQ ID NO:105) y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO:106).

Las figuras 32A-C describen secuencias de aminoácidos y una secuencia de ácido nucleico para un S4-Fab. La figura 32 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S4-Fab (SEQ ID

NO:107), una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de S4-Fab (SEQ ID NO:108) y una secuencia de ácidos nucleicos de un vector que codifica las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO:109).

5 Las figuras 33A-F describen una secuencia de cadena ligera de S4 de una proteína IgG. Más específicamente, la figura 33 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S4 (SEQ ID NO:110) y la secuencia de ácidos nucleicos de un vector que codifica la secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:111).

Las figuras 34A-G describen una secuencia de cadena pesada de S4 de una proteína IgG. Más específicamente, la figura 34 muestra una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena pesada de S4 (SEQ ID NO:112) y la secuencia de ácidos nucleicos de un vector que codifica la secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:113).

10 La figura 35 muestra la frecuencia de aminoácidos en las secuencias de cadena ligera de anticuerpos humanos a partir de la base de datos de Kabat.

La figura 36 muestra una realización ilustrativa de un diseño de grupos de codones adecuados.

La figura 37 es una realización ilustrativa de grupos de codones de degeneración de diversidad limitada (también referido aquí como "no aleatorios") para la diversificación de CDR L1, L2 y L3.

15 La figura 38 es una realización ilustrativa de grupos de codones de degeneración de diversidad limitada (también referido aquí como "no aleatorios") para la diversificación de CDR L1, L2 y L3.

La figura 39 es una realización ilustrativa de grupos de codones de degeneración de diversidad limitada (también referido aquí como "no aleatorios") para la diversificación de CDR L3.

20 La figura 40 es una realización ilustrativa de grupos de codones de degeneración de diversidad limitada (también referido aquí como "no aleatorios") para la diversificación de CDR L1, L2 y L3.

La figura 41 muestra un análisis por citometría de flujo de poblaciones de células 293, HeLa, HT1080 o HUVEC tratadas con (1) anticuerpos anti-HIS, (2) anticuerpos anti-HIS y proteína STOP-1 o (3) anticuerpos anti-flag y proteína STOP-1, seguido del tratamiento con anticuerpos anti-ratón de cabra conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Un número pequeño insignificante de células se unieron a los anticuerpos anti-flag (es decir, los picos en la esquina izquierda del eje X en los gráficos de 293, HeLa y HT1080). El eje X indica el número de células (intensidad de señal de fluoresceína logarímicamente). El eje Y indica el nivel de fluorescencia emitido por las células marcadas (casos).

25 La figura 42 muestra un análisis FACS de poblaciones de células HT1080 tratadas con (1) anticuerpos anti-HIS, (2) anticuerpos anti-HIS y proteína STOP-1, (3) anticuerpos anti-flag y proteína STOP-1, (3) proteína STOP-1, (4) proteína STOP-1 y anticuerpos S7 o (5) STOP-1 y anticuerpos 6b12, seguido del tratamiento con anticuerpos anti-ratón de cabra conjugados con FITC.

La figura 43 representa la migración de células HT1080 (número de células) en una cámara quimiotáctica Boyden modificada después del tratamiento con bFGF o STOP-1 ("762") o un control negativo.

30 La figura 44 muestra un análisis FACS de la unión de STOP-1 a células MDA435 en presencia y ausencia de un anticuerpo anti-STOP-1 (6B12) o un anticuerpo de control (4B7). El anticuerpo de detección, anticuerpos anti-flag M2 -FITC, no realizaba la unión STOP-1.

La figura 45 es un gráfico que muestra el cambio de veces en la expresión de ARNm de STOP-1 después del tratamiento (A) bajo condiciones hipóxicas durante 8 y 34 horas o (B) bajo condiciones normóxicas durante 3, 8 y 34 horas, en presencia y ausencia de TNF α humana recombinante.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0036] Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína STOP-1 según la presente invención incluye, por ejemplo, SEQ ID NO:1 y las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de la figura 1.

SEQ ID NO:1

GGAGAGAGGCGCGCGGGTGAAAGGCGCATTGATGCAGCCTGCGGCGGCCTCGGAGCGCGG
 CGGAGCCAGACGCTGACCACGTTCTCTCTCGGTCTCCTCCGCCTCCAGCTCCGCGCTG
 5 CCGGCAGCCGGGAGGCCATGCGACCCAGGGCCCCGCGCCTCCCCGCAGCGGCTCCGCG
 GCCTCCTGCTGCTCCTGCTGCTGCAGCTGCCCGCGCCGTGAGCGCCTCTGAGATCCCCA
 AGGGGAAGCAAAAGGCGCAGCTCCGGCAGAGGGAGGTGGTGGACCTGTATAATGGAATGT
 GCTTACAAGGGCCAGCAGGAGTGCCTGGTCGAGACGGGAGCCCTGGGGCCAATGTTATTC
 CGGGTACACCTGGGATCCCAGGTGCGGATGGATTCAAAGGAGAAAAGGGGGAATGTCTGA
 GGGAAAGCTTTGAGGAGTCCTGGACACCCAACTACAAGCAGTGTTTCATGGAGTTCATTGA
 ATTATGGCATAGATCTTGGGAAAATTGCGGAGTGTACATTTACAAAGATGCGTTCAAATA
 GTGCTCTAAGAGTTTTTGTTCAGTGGCTCACTTCGGCTAAAATGCAGAAATGCATGCTGTC
 10 AGCGTTGGTATTTTACATTCAATGGAGCTGAATGTTTCAGGACCTCTTCCCATTGAAGCTA
 TAATTTATTTTGACCAAGGAAGCCCTGAAATGAATTCAACAATTAATATTCATCGCACTT
 CTTCTGTGGAAGGACTTTTGTGAAGGAATTGGTGTGGATTAGTGGATGTTGCTATCTGGG
 TTGGCACTTGTTTCAGATTACCCAAAAGGAGATGCTTCTACTGGATGGAATTCAGTTTCTC
 GCATCATTATTGAAGAACTACCAAAATAAATGCTTTAATTTTCATTTGCTACCTCTTTTTT
 TTATTATGCCTTGGAATGGTTCACTTAAATGACATTTTAAATAAGTTTATGTATACATCT
 GAATGAAAAGCAAAGCTAAATATGTTTACAGACCAAAGTGTGATTTACACTGTTTTTAA
 ATCTAGCATTATTCATTTTGCTTCAATCAAAAGTGGTTTCAATATTTTTTTTAGTTGGTT
 15 AGAATACTTTCTTCATAGTCACATTCTCTCAACCTATAATTTGGAATATTGTTGTGGTCT
 TTTGTTTTTTCTCTTAGTATAGCATTTTTTAAAAAATATAAAAGCTACCAATCTTTGTAC
 AATTTGTAAATGTTAAGAATTTTTTTTATATCTGTTAAATAAAAATTATTTCCAACA

[0037] Los términos "STOP-1," "proteína STOP-1," "polipéptido STOP-1" (también referido como UNQ762 o 762), tal como se utilizan aquí, incluyen polipéptidos de secuencia nativa, variantes de polipéptidos y fragmentos de polipéptidos de secuencia nativa y variantes de polipéptido (que se definen posteriormente aquí), a menos que se especifique lo contrario. Las proteínas STOP-1 se pueden obtener a partir de varias especies, por ejemplo, humanos, mediante la utilización de anticuerpos según la presente invención o mediante métodos recombinantes o sintéticos, incluyendo moléculas de ácido nucleico depositadas. Una forma oligomérica de STOP-1 incluye una STOP-1 humana que tiene sólo los residuos 94-243, o una parte de la misma. Una forma oligomérica según la presente invención puede incluir un dímero, un trímero y un hexámero de STOP-1. Según una realización preferida, la forma oligomérica de STOP-1 es un trímero.

[0038] Un polipéptido de "secuencia nativa" o polipéptido "nativo" es aquel que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) derivado de la naturaleza. Un polipéptido de "secuencia nativa" es aquel que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir mediante medios recombinantes o sintéticos. De este modo, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la misma secuencia de aminoácidos de un polipéptido humano natural, polipéptido murino o polipéptido de cualquiera de otra especie de mamífero. Un polipéptido STOP-1 de "secuencia nativa" o un polipéptido STOP-1 "nativo" comprenden un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido STOP-1 derivado de la naturaleza. Por ejemplo, en una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia nativa de STOP-1 humano se puede encontrar en la SEQ ID NO:2 y la figura 2.

SEQ ID NO:2

MRPQGPAASPQRLRGLLLLLLLLQLPAPSSASEIPKGKQKAQLRQREVVDLYNGMCLQ
 GPAGVPGRDGSPGANVIPGTPGIPGRDGFKEGKECLRESFEESWTPNYKQCSWSSL
 NYGIDLKIAECTFTKMRSNSALRVLFSGSLRLKCRNACCQRWYFTFNGAECGSLPI
 40 EAIYLDQGSPEMNSTINIHRSTSSVEGLCEGIGAGLVDAIWWVGTCSDYPKGDASTGW
 NSVSRIMEELPK

[0039] Dichos polipéptidos STOP-1 se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir mediante medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido o proteína de "secuencia nativa" o "nativo" comprende específicamente formas truncadas naturales o secretadas de la proteína STOP-1, formas variantes naturales (por ejemplo, formas empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos STOP-1 de secuencia nativa aquí descritos son polipéptidos de

secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprende secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras que se acompañan.

[0040] La localización aproximada de los "péptidos señal" de los varios polipéptidos STOP-1 aquí descritos se pueden observar en la presente memoria y/o las figuras que se acompañan. También se sabe que, en algunos casos, la separación de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, dando lugar a más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, donde el péptido señal se separa en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite C-terminal del péptido señal aquí identificado, y los polinucleótidos que los codifica, se contemplan en la presente invención.

[0041] "Variante de polipéptido STOP-1" significa un polipéptido STOP-1 que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido STOP-1 de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido STOP-1 que carece del péptido señal o el dominio de triple hélice tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido STOP-1 de longitud completa tal como se describe aquí (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa solo una parte de la secuencia codificante completa de un polipéptido STOP-1 de longitud completa). Dichas variantes de polipéptido STOP-1 incluyen, por ejemplo, polipéptidos STOP-1 en los que se añaden, o eliminan, uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Normalmente, un polipéptido STOP-1 tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos, con una secuencia del polipéptido STOP-1 de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido STOP-1 que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio de triple hélice de un polipéptido STOP-1, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido STOP-1 de longitud completa tal como se describe aquí. Normalmente, las variantes de polipéptido STOP-1 tienen por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, las variantes de polipéptido STOP-1 tendrán no más de una sustitución de aminoácido conservativa en comparación con la secuencia de polipéptido STOP-1 nativa, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 sustituciones conservativas de aminoácido en comparación con la secuencia de polipéptido STOP-1 nativa.

[0042] El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" con respecto a secuencias del polipéptido STOP-1 aquí identificadas se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia específica del polipéptido STOP-1, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la tabla 1 siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

[0043] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para la comparación de secuencia de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el

número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A. Como ejemplos de cálculo de % de identidad de la secuencia de aminoácidos utilizando este método, las tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designada como "proteína de comparación" con la secuencia de aminoácidos designada como "STOP-1", en la que "STOP-1" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido STOP-1 hipotético de interés, "proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que el polipéptido "STOP-1" de interés se compara, e "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos diferentes. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizados aquí se obtienen tal como se describe en párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

[0044] El "polinucleótido variante de STOP-1" o "secuencia de ácidos nucleicos variante de STOP-1" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido STOP-1, preferiblemente un polipéptido STOP-1 activo, tal y como se define aquí, y que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido STOP-1 de secuencia nativa y de longitud completa tal y como se describe aquí, una secuencia de polipéptido STOP-1 de secuencia nativa y de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe aquí, el dominio de triple hélice de un polipéptido STOP-1, con o sin el péptido señal, tal y como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido STOP-1 de longitud completa tal y como se describe aquí (por ejemplo, los residuos 94-243 de STOP-1 humano). Habitualmente, un polinucleótido variante de STOP-1 tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido STOP-1 de secuencia nativa y de longitud completa tal y como se describe aquí, una secuencia de polipéptido STOP-1 de secuencia nativa y longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe aquí, el dominio de triple hélice de un polipéptido STOP-1, con o sin el péptido señal, tal y como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido STOP-1 de longitud completa tal y como se describe aquí. Las variantes no comprenden la secuencia de nucleótidos nativa.

[0045] Habitualmente, los polinucleótidos variantes de STOP-1 tienen por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos referenciada más o menos un 10% de esa longitud referenciada.

[0046] El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el STOP-1 identificadas aquí se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica STOP-1 de interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

[0047] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencia de ácidos nucleicos, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D)

se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos denominada "ADN de comparación" con la secuencia de ácidos nucleicos denominada "STOP-1-DNA", donde "STOP-1-DNA" representa una secuencia de ácidos nucleicos hipotética que codifica STOP-1 de interés, "ADN de comparación", representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la que se compara la molécula de ácido nucleico "STOP-1-DNA" de interés, y "N", "L" y "V" cada uno representa nucleótidos hipotéticos. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizados aquí se obtienen tal como se describe en párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

[0048] En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de STOP-1 son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido STOP-1 y que son capaces de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado astringentes, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido STOP-1 de longitud completa tal como se describe aquí. Los polipéptidos variantes de STOP-1 pueden ser aquellos codificados por un polinucleótido variante de STOP-1.

[0049] El término "región codificante de longitud completa" cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico que codifica un polipéptido STOP-1 se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido STOP-1 de longitud completa de la invención (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan). El término "región codificante de longitud completa" cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico depositado en ATCC se refiere a la parte del ADNc que codifica el polipéptido STOP-1 que se inserta en el vector depositado con la ATCC (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan).

[0050] El término "aislado", cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos STOP-1 descritos aquí, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéutico para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido STOP-1 no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0051] Un ácido nucleico "aislado" que codifica un polipéptido STOP-1 u otro ácido nucleico que codifica un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislada es una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido se diferencian de la molécula de ácido nucleico específica que codifica un polipéptido tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0052] El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0053] Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una

secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

[0054] La "astringencia" de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0055] Condiciones astringentes" o "condiciones de astringencia elevada", tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) una hibridación durante la noche en una solución que utiliza formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con un lavado de 10 min a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) seguido de un lavado de astringencia elevada de 10 min que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

[0056] Las "condiciones moderadamente astringentes" se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. necesarias para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

[0057] El término "epítipo etiquetado", cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido STOP-1 o un anticuerpo anti-STOP-1 fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo contra el que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos). Se contemplan los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención que son epítopos etiquetados.

[0058] "Biológicamente activo" y "actividad biológica" y "características biológicas" con respecto a STOP-1 significa (1) que tiene la capacidad de incrementar la proliferación celular de por lo menos un tipo de células de mamífero (por ejemplo, 3T3) in vivo o ex vivo; (2) que tiene la capacidad de unirse específicamente a STOP-1, y/o (3) que tiene la capacidad de modular de otro modo la señalización de STOP-1 o la actividad de STOP-1, excepto cuando se especifique lo contrario.

[0059] "Biológicamente activo" y "actividad biológica" y "características biológicas" con respecto al polipéptido STOP-1 modificado o un polipéptido STOP-1 (1) que tiene la capacidad bloquear, inhibir o neutralizar parcialmente una actividad biológica de un STOP-1 nativo (de forma antagonista o de bloqueo); (2) que tiene la capacidad de unirse específicamente a STOP-1; y/o (3) que tiene la capacidad de modular la señalización de STOP-1 o la actividad de STOP-1, excepto cuando se especifique lo contrario.

[0060] "Biológicamente activo" y "actividad biológica" y "características biológicas" con respecto a un anticuerpo anti-STOP-1 de la presente invención significa (1) que tiene la capacidad de bloquear parcial o totalmente, inhibir o neutralizar una actividad biológica de un STOP-1 nativo (de manera antagonista o de bloqueo); (2) que tiene la capacidad de unirse específicamente a STOP-1; y/o (3) que tiene la capacidad de modular la señalización de STOP-1 o la actividad de STOP-1, excepto cuando se especifique lo contrario. En una realización preferida, un anticuerpo de la presente invención se une a STOP-1 con una afinidad de por lo menos 1 uM o menos, 100nm o menos, 50 nm o menos, 10 nm o menos, 5 nM o menos, 1 nm o menos. Tal como se utiliza aquí, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las partes de la cadena ligera y pesada de moléculas de anticuerpos que incluyen secuencias de aminoácidos de Regiones Determinantes de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3), y Regiones Armazón (FRs). VH se refiere al dominio variable de la cadena pesada. VL se refiere al dominio variable de la cadena ligera. Según los métodos utilizados en la presente invención, las posiciones de aminoácidos asignados a CDR y FR se definen según Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). La numeración de aminoácidos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también es según Kabat.

[0061] Tal como se utiliza aquí, "grupo de codones" se refiere a un grupo de secuencias de tripletes de nucleótidos diferentes utilizadas para codificar aminoácidos variantes deseados. Se puede sintetizar un grupo de oligonucleótidos, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida, que contienen secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionados por el grupo de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. Una forma estándar de la designación de codones es la del código IUB, que es conocida en la técnica y se describe en el presente documento. Un "grupo de codones no aleatorios", tal como se utiliza aquí, se refiere por tanto a un grupo de codones que codifica aminoácidos seleccionados que cumplen parcialmente, preferiblemente completamente, el criterio para la selección de aminoácidos tal como se describe aquí. La síntesis de oligonucleótidos con la "degenerancia" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones es conocida en la técnica, por ejemplo, la estrategia TRIM (Knappet et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 1999); Garrard y Henner, Gene 128:103, 1993). Dichos grupos de oligonucleótidos que tienen ciertos grupos de codones se pueden sintetizar utilizando sintetizadores de ácidos nucleicos comerciales (disponible de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un grupo de oligonucleótidos sintetizados que tienen un grupo particular de codones incluirá habitualmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el grupo de codones en la secuencia global. Los oligonucleótidos, tal como se utilizan en la presente invención, presentan secuencias que permiten la hibridación a una plantilla de ácidos nucleicos de dominio variable y también pueden, pero no necesariamente, incluir sitios de enzimas de restricción útiles para, por ejemplo, fines de clonación.

[0062] "ADN heterólogo" es cualquier ADN que se introduce en una célula huésped. El ADN puede derivar de una variedad de fuentes que incluyen ADN genómico, ADNc, ADN sintético y fusiones o combinaciones de éstos. El ADN puede incluir ADN de la misma célula o tipo de célula como la célula huésped o receptora o ADN de un tipo de célula diferente, por ejemplo, de un mamífero o planta. El ADN puede incluir, opcionalmente, genes marcadores o de selección, por ejemplo, genes de resistencia a antibiótico, genes de resistencia a temperatura, etc. Se contemplan las células huésped que codifican ADN heterólogos que comprenden los polipéptidos UNQ y anticuerpos de la presente invención, así como su utilización.

[0063] Tal como se utiliza aquí, "posición altamente diversa" se refiere a una posición de un aminoácido localizado en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada que tienen un número de aminoácido diferente representado en la posición cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno conocidos y/o naturales. Las posiciones altamente diversas están habitualmente en las regiones CDR. En un aspecto, la capacidad para determinar posiciones altamente diversas en anticuerpos conocidos y/o naturales es facilitada por los datos proporcionados por Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991). La base de datos de internet localizada en <http://immuno.bme.nwu.edu> proporciona una amplia colección y alineación de secuencias de cadena ligera y pesada humanas y facilita la determinación de posiciones altamente diversas en estas secuencias. Según la presente invención, una posición de aminoácido es altamente diversa si tiene preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 11, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, y preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 posibles variaciones de residuos de aminoácidos en esa posición. En algunas realizaciones, una posición de aminoácido es altamente diversa si tiene preferiblemente por lo menos aproximadamente 2, preferiblemente por lo menos aproximadamente 4, preferiblemente por lo menos aproximadamente 6, y preferiblemente por lo menos aproximadamente 8 posibles variaciones diferentes de residuos de aminoácidos en esa posición.

[0064] Tal como se utiliza aquí, "biblioteca" se refiere a una pluralidad de secuencias de anticuerpo o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, polipéptidos de la invención), o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, siendo las secuencias diferentes en la combinación de variantes de aminoácidos que se introducen en estas secuencias según los métodos de la invención.

[0065] "Expresión en fagos" es una técnica por la que se expresan polipéptidos variantes como proteínas de fusión a una proteína de cubierta en la superficie de fago, por ejemplo, partículas de fago filamentoso. Una

utilidad de la expresión en fagos está en el hecho de que se pueden clasificar de manera rápida y eficaz amplias bibliotecas de variantes de proteínas aleatorizadas para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con afinidad elevada. La expresión de bibliotecas de péptidos y proteínas en fagos se ha utilizado para el cribado de millones de polipéptidos para aquellos con propiedades de unión específicas. Los métodos de expresión en fagos polivalentes se han utilizado para la expresión de péptidos aleatorios pequeños y proteínas pequeñas a través de fusiones con el gen III o el gen VIII de fagos filamentosos. Wells y Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:355-362 (1992), y referencias citadas en la misma. En la expresión de fagos monovalentes, se fusiona una biblioteca de proteínas o péptidos a un gen III o una parte del mismo y se expresa a niveles bajos en presencia de la proteína del gen III de tipo natural, de manera que las partículas de fagos expresan una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de avidez se reducen en relación con los fagos polivalentes, de manera que la clasificación es en base a la afinidad intrínseca de ligando y se utilizan vectores fagémidos, que simplifican las manipulaciones de ADN. Lowman y Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991).

[0066] Un "fagémido" es un vector plásmido que tiene un origen bacteriano de replicación, por ejemplo, Co1E1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido se puede utilizar en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo bacteriófago filamentosos y bacteriófago lamboide. El plásmido también contendrá en general un marcador seleccionable para resistencia a antibiótico. Los segmentos de ADN clonado en estos vectores se pueden propagar como plásmidos. Cuando se proporcionan las células que albergan estos vectores con todos los genes necesarios para la producción de partículas de fagos, el modo de replicación del plásmido cambia a replicación en círculo rodante para generar copias de una cadena del ADN plasmídico y empaquetar las partículas de fagos. El fagémido puede formar partículas de fagos infecciosos o no infecciosos. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de cubierta de fago o fragmento del mismo unido a un gen de polipéptido heterólogo como una fusión génica, de manera que el polipéptido heterólogo se expresa en la superficie de la partícula de fago.

[0067] El término "vector fago" significa una forma replicativa de doble cadena de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y capaz de replicación. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación del fago y la formación de partículas de fago. El fago es preferiblemente un bacteriófago filamentosos, tal como un fago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado del mismo o un fago lamboide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado del mismo.

[0068] Tal como se utiliza aquí, "aminoácido diana" se refiere a un aminoácido que pertenece al grupo de aminoácidos que son colectivamente los aminoácidos naturales más habituales hallados en una posición particular de anticuerpos conocidos y/o naturales o fragmentos de unión a antígeno. En algunas realizaciones, los aminoácidos naturales más habituales son aquellos aminoácidos que se hallan en una posición particular en preferiblemente por lo menos aproximadamente 50%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 70%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 80%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, preferiblemente todas las secuencias de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conocidos y/o naturales. En algunas realizaciones, los aminoácidos naturales más habituales son aquellos aminoácidos que se hallan en una posición particular en preferiblemente de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%, preferiblemente de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, preferiblemente de aproximadamente 70% a aproximadamente 85%, preferiblemente de aproximadamente 80% a aproximadamente 85% de las secuencias de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conocidos y/o naturales. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conocidos son aquellos cuyas secuencias están disponibles en la técnica, tales como los disponibles en bases de datos públicas, tales como las bases de datos de Kabat ("Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991) y/o localizadas en <http://immuno.bme.nwu.edu>. La posición de aminoácido es preferiblemente una posición en la región CDR. Un grupo de aminoácidos diana se refiere a un grupo de aminoácidos diana para una posición particular. Preferiblemente, un aminoácido diana no un residuo de cisteína. Para las posiciones en CDR1, CDR3, CDR3 de cadena ligera y para CDR1 y CDR2 de cadena pesada, habitualmente, un grupo de aminoácidos diana puede incluir de preferiblemente aproximadamente dos a aproximadamente once, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, preferiblemente aproximadamente 6 aminoácidos en una posición particular altamente diversa y accesible a disolvente de la secuencia origen.

[0069] El término "proteoglicano" se refiere a una molécula en la que por lo menos una cadena lateral de glicosaminoglicano está unido covalentemente al núcleo proteico de la molécula. Una línea celular deficiente en la síntesis de proteoglicanos según la presente invención incluye una línea celular que es deficiente en galactosiltransferasa I. Según una realización preferida, la línea celular es una línea celular CHO-psbg.

[0070] El término "antagonista" es cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido STOP-1 nativo y que se une específicamente a un polipéptido STOP-1 nativo, en el que la unión del antagonista (1) es a un polipéptido STOP-1 nativo en forma oligomérica, (2) es a los residuos 94-243 de STOP-1 humano nativo y/o (3) se puede inhibir (por ejemplo, tal como se observa en un ensayo ELISA competitivo utilizando STOP-1 y 6B12) por un anticuerpo monoclonal de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo depositado de la presente invención, etc.). Según una realización, el antagonista es

un polipéptido. Según otra realización, el anticuerpo 6B12 puede inhibir la unión del antagonista a STOP-1. Según otra realización, el antagonista se une a un residuo en los residuos 33-52 o 33-53 de STOP-1 humano o un equivalente de STOP-1 no humano de los mismos.

5 [0071] El término "antagonista de molécula pequeña" se refiere a cualquier molécula en la que el peso molecular es 1500 daltons o menos y es un antagonista según la presente invención. Según una realización, el antagonista de molécula pequeña es inferior a aproximadamente 500 Daltons.

10 [0072] Según una realización preferida, el antagonista bloquea, inhibe o neutraliza la proliferación celular en células que expresan STOP-1 nativo. En una realización, el antagonista o antagonista de molécula evita la migración de una célula a la que se une STOP-1. En una realización preferida, el antagonista o antagonista de molécula pequeña se une específicamente a una forma trimérica de STOP-1. Los antagonistas adecuados incluyen anticuerpos, variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos STOP-1 nativos, péptidos, de la presente invención, etc. Los métodos para identificar antagonistas de un polipéptido STOP-1 pueden comprender contactar un polipéptido STOP-1 con una molécula de antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas con el polipéptido STOP-1.

15 [0073] El término "potenciador" se refiere a cualquier molécula que aumenta la actividad biológica de un polipéptido STOP-1 nativo y que se une específicamente a un polipéptido STOP-1 nativo, en el que el potenciador se puede unir a una forma oligomérica de un polipéptido STOP-1 nativo y tiene por lo menos una actividad adicional seleccionada del grupo que consiste en (1) es capaz de unirse a un residuo en los residuos 94-243 de STOP-1 humano nativo, (2) es capaz de agregar STOP-1 en una célula; y (3) puede competir por un
20 anticuerpo monoclonal con un anticuerpo S7 o S4 de la presente invención (por ejemplo, tal como se observa en un ensayo ELISA competitivo utilizando STOP-1, S7 o S4 y el potenciador). Según una realización, el potenciador incrementa la unión de STOP-1 a una célula (por ejemplo, células HWE, células HeLa, y células HT1080). En una realización preferida, el agonista se une a una forma trimérica de STOP-1. Los métodos para identificar agonistas de un polipéptido STOP-1 pueden comprender poner en contacto una célula que se une a
25 STOP-1 con un polipéptido STOP-1 y el agonista candidato y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas con el polipéptido STOP-1 (por ejemplo, la unión incrementada del polipéptido STOP-1, proliferación celular o migración celular).

30 [0074] "Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere a tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas, en los que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la enfermedad o trastorno patológico reconocido. Aquellos con necesidad del tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que debe prevenirse el trastorno. Estos términos que indican los usos terapéuticos y profilácticos en el presente documento son satisfactorios si mejoran, disminuyen o decrecen los síntomas, complicaciones u otros problemas asociados con una enfermedad o mejora, disminuyen o decrecen la posibilidad de iniciar o la frecuencia de los síntomas, complicaciones u otros problemas asociados
35 con una enfermedad.

[0075] Un sujeto o mamífero se trata "satisfactoriamente" para un cáncer que expresa el polipéptido STOP-1 si, después de recibir una cantidad terapéutica de un antagonista según los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible en presencia o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de las células cancerosas; reducción en el tamaño
40 tumoral; inhibición (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, que incluye la expansión del cáncer en tejido blando y huesos; inhibición (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierto grado, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducida, y mejora en la calidad de vida. Siempre que el anticuerpo anti-STOP-1 o el oligopéptido de unión a STOP-1 puedan prevenir el crecimiento y/o la eliminación de células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser sentidos por el paciente.

[0076] Un sujeto o mamífero se trata "satisfactoriamente para angiogénesis anormal si, después de recibir una cantidad terapéutica de un antagonista o agonista según los métodos de la presente invención, el paciente
50 muestra una reducción observable y/o medible; y/o alivio en cierto grado, de uno o más de los síntomas asociados con la angiogénesis anormal; y mejora en la calidad de vida.

[0077] Los parámetros anteriores para evaluar un tratamiento satisfactorio y una mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos de rutina familiares para el médico. Para la terapia contra el cáncer, se puede medir la eficacia, por ejemplo, mediante la valoración del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o la determinación de la tasa de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar mediante tests de estadificación y mediante escaneo óseo y tests de los niveles de calcio y otras enzimas para determinar la expansión hacia los huesos. Los escaneos CT también se pueden realizar para buscar la expansión hacia la pelvis y los nódulos linfáticos en el área. Los rayos X del pecho y la medición de los niveles de enzimas hepáticas mediante métodos conocidos se utilizan para buscar metástasis hacia pulmones e hígado,
55

respectivamente. Otros métodos de rutina para monitorizar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia con aguja transrectal (TRNB).

[0078] Para el cáncer de vejiga, que es un cáncer más localizado, los métodos para determinar el progreso de la enfermedad incluyen la evaluación citológica urinaria mediante citoscopia, la monitorización de la presencia de sangre en la orina, la visualización del tracto urotelial mediante sonografía o un pielograma intravenosa, tomografía computerizada (CT) y obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI). La presencia de metástasis distante se puede evaluar mediante CT del abdomen, rayos X del pecho, o obtención de imágenes por radionucleidos del esqueleto.

[0079] Administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutica inicial durante un periodo de tiempo largo. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es más bien cíclico por naturaleza.

[0080] El término "mamífero" con el propósito de tratamiento, o alivio de los síntomas o diagnóstico del cáncer, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero (también conocido como "paciente"), incluyendo el hombre, animales domésticos y de granja, y animales del zoo, competiciones deportivas o de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos etc. Preferiblemente, el mamífero es el hombre.

[0081] La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (a la vez) y la administración consecutiva en cualquier orden.

[0082] "Portadores", tal como se utiliza aquí, incluyen los portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos para la célula o para el mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones utilizadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Ejemplos de portadores aceptables fisiológicamente incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferiores a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

[0083] Por "fase sólida" o "soporte sólido" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir o unir un anticuerpo, un antagonista o un polipéptido de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas comprendidas en la presente invención incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), de polisacáridos (por ejemplo, agarosa), de poliácridamidas, de poliestireno, de polivinil alcohol y de siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como las descritas en la patente de Estados Unidos no. 4.275.149.

[0084] Tal como se utiliza aquí, el término "inmunoadhesina" designa moléculas de tipo anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente del reconocimiento de antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina habitualmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o un ligando – tal como una parte de una proteína STOP-1 nativa. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD, o IgM.

[0085] Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido STOP-1, un anticuerpo para el mismo o un oligopéptido de unión a STOP-1) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0086] Una molécula "pequeña" o molécula orgánica "pequeña" se define en la presente invención por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

[0087] Una "cantidad eficaz" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición tal como se describe aquí, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un objetivo específicamente indicado. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente y de forma rutinaria, en relación al objetivo indicado.

[0088] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido o antagonista de la presente invención eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un mamífero (también conocido como paciente). En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar, en cierto grado, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición de “tratamiento” en la presente invención. Siempre que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o la citólisis de células cancerosas existentes, puede ser citostático o citotóxico.

[0089] Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y por los métodos conocidos o mediante los ejemplos aquí proporcionados.

[0090] Una “cantidad citotóxica” de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad citotóxica” de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y mediante métodos conocidos en la técnica.

[0091] El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-STOP-1 únicos (incluyendo agonista, antagonista y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-STOP-1 con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-STOP-1 de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-STOP-1 (ver a continuación), siempre que se unan específicamente a un polipéptido STOP-1 nativa y/o muestren una actividad biológica o actividad inmunológica de la presente invención. Según una realización, el anticuerpo se une a una forma oligomérica de STOP-1, por ejemplo, una forma trimérica. En una realización adicional, el anticuerpo se une específicamente a STOP-1 humana entre los residuos 94-243. Según otra realización, el anticuerpo se une específicamente a STOP-1, cuya unión se puede inhibir por un anticuerpo monoclonal de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo depositado de la presente invención, etc.). La frase “fragmento o análogo funcional” de un anticuerpo es un compuesto que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo al que se refiere. Por ejemplo, un fragmento o análogo funcional de un anticuerpo anti-STOP-1 puede ser aquel que se una específicamente a una molécula STOP-1. En una realización, el anticuerpo puede evitar o sustancialmente reducir la capacidad de una molécula STOP-1 de inducir la proliferación celular. El término “inmunoglobulina” (Ig) se utiliza aquí de manera intercambiable con “anticuerpo”. Según una realización, un anticuerpo de la presente invención no se une a un peptide que tiene la secuencia de aminoácidos GWNSVSRIIIIEELPK (SEQ ID NO:117).

[0092] Un “anticuerpo aislado” es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) en más de un 95% en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry, y aún más preferiblemente en más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0093] La unidad básica del anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5, la unidad heterotetramérica básica junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y, por tanto, contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgGs, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.00 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente separados. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes

clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

[0094] La cadena L de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen las cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en base a diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de C_H , por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

[0095] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo del tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones armazón ("framework") (FRs) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0096] El término "region hipervariable" cuando se utiliza aquí, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsable de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende, en general, residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de aproximadamente 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL, y alrededor de aproximadamente 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la VH (en una realización, H1 es alrededor de aproximadamente 31-35); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en la VL, y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en la VH; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

[0097] El término "anticuerpo monoclonal", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, animales o vegetales eucariotas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), y los ejemplos siguientes, por ejemplo.

[0098] Entre los anticuerpos monoclonales de la presente invención se incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (véase, Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente invención incluyen anticuerpos "primitizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del viejo Mundo, Simio, etc) y secuencias de la región constante humana.

[0099] Un anticuerpo "íntacto" es aquel que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un C_L y por lo menos los dominios constantes de cadena pesada C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes en la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo íntacto tiene una o más funciones efectoras.

[0100] Los "fragmentos de anticuerpos" comprende una parte de un anticuerpo íntacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo íntacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diabodies; anticuerpos lineales (véase la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La expresión "anticuerpos lineales" se refiere en general a los anticuerpos descritos en Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden una pareja de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman una pareja de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

[0101] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento de Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, presenta un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos de Fab unidos por puentes disulfuro que tienen una actividad de unión a antígeno divalente y aún es capaz de reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes transportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0102] El fragmento Fc comprende las partes carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

[0103] "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. A partir del pliegue de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada una de las cadenas H y L) que contribuyen con los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y que confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0104] "Fv de cadena única", también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo conectados en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

[0105] El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L, de manera que se consigue el emparejamiento de los dominios V entre cadenas, pero no intracadenas, dando lugar a un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos de sFv de entrecruzamiento ("crossover"), donde los fragmentos V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

[0106] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) donde los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón ("framework") (FR) de la

inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

[0107] Un "anticuerpo dependiente de especie", por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE humano de mamífero, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie mamífera que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} y lo más preferible no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero presenta una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humana que es por lo menos aproximadamente 50 veces, o por lo menos aproximadamente 500 veces, o por lo menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

[0108] Un "oligopéptido de unión a STOP-1" es un oligopéptido que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido STOP-1 tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a STOP-1 se pueden sintetizar químicamente utilizando metodología de síntesis conocida de oligopéptidos o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a STOP-1 tienen por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, en el que dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido STOP-1 tal como se describe aquí. Según una realización, el oligopéptido de unión a STOP-1 se une a la misma región o solapante que se une el anticuerpo 6B12. Los oligopéptidos de unión a STOP-1 se pueden identificar sin gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:178-182 (1985); Geysen et al., in *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen et al., *J. Immunol. Meth.*, 102:259-274 (1987); Schoofs et al., *J. Immunol.*, 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668).

[0109] Un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno polipéptido diana asociado a un tumor, tal como STOP-1, es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad, de manera que un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el reconocimiento de una célula o tejido que expresa el antígeno, y no reacciona de forma cruzada significativamente con otras proteínas. En dichas realizaciones, el grado de unión del polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición a una proteína "no diana" será inferior a aproximadamente el 10% de la unión del polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición a su proteína diana particular determinado mediante análisis de separación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición a una molécula diana, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular significa que la unión es mediblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, mediante la determinación de la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que en general es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica la unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por una diana no marcada en exceso. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular tal como se utiliza aquí se puede mostrar, por una molécula que tiene una K_d para la diana de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-7}

M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-12} M, o superior. En una realización, el término “unión específica” se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo de polipéptido (por ejemplo, una proteína no STOP-1). Se entiende que un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido STOP-1 nativo humano también puede unirse a un polipéptido STOP-1 nativo no humano.

[0110] Un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición que “inhibe el crecimiento” de células tumorales que expresan un polipéptido STOP-1 o un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición “inhibidor del crecimiento” es aquel que da lugar a la inhibición medible del crecimiento de células cancerosas que expresan o sobreexpresan el polipéptido STOP-1 apropiado. Los polipéptidos, anticuerpos, antagonistas o composiciones inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células tumorales que expresan STOP-1 en más del 20%, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, e incluso más preferiblemente, en más del 50% (por ejemplo, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%) en comparación con el control apropiado, siendo habitualmente el control las células tumorales no tratadas con el polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de análisis. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en el cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de células tumorales in vivo se puede determinar de varias maneras, tales como las descritas en la sección de ejemplos experimentales siguiente. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti-STOP-1 en aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción del tamaño tumoral o la proliferación de células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en aproximadamente de 5 a 30 días.

[0111] Las “funciones efectoras” de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de una variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y la activación de células B.

[0112] “Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” o “ADCC” se refieren a una forma de citotoxicidad en que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas (“killer”) naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y, posteriormente, eliminan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para dicha eliminación. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan Fc γ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar in vivo, por ejemplo en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998).

[0113] Los términos “receptor Fc” o “FcR” describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una FcR humana de secuencia nativa. Además, una FcR preferida es aquella que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas (“spliced”) de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un “receptor de activación”) y Fc γ RIIB (un “receptor de inhibición”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación Fc γ RIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos por el término “FcR” aquí. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976); y Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

[0114] “Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos Fc γ RIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMCs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

[0115] "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación del mecanismo de complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

[0116] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de célula escamosa (por ejemplo, cáncer de célula escamosa epitelial), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de células B, cáncer de cerebro, así como cáncer de cabeza y cuello, y las metástasis asociadas.

[0117] Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación anormal de células. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer. En una realización, el trastorno proliferativo celular es desmoplasia.

[0118] "Tumor", tal como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, tanto malignas como benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

[0119] El término angiogenesis anormal según la presente invención tiene lugar cuando nuevos vasos sanguíneos crecen excesivamente, de manera insuficiente o inapropiada (por ejemplo, siendo la localización, la evolución o la aparición de la angiogénesis indeseada desde un punto de vista médico) en un estado patológico o de manera que causa un estado patológico. Una "angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada" tiene lugar en un estado patológico cuando existe crecimiento de vasos sanguíneos que contribuye al empeoramiento del estado patológico, tal como en cáncer, especialmente tumores sólidos vascularizados y tumores metastásicos (incluyendo cáncer de colon, cáncer de pulmón (especialmente cáncer de pulmón de célula pequeña), o cáncer de próstata), enfermedades causadas por la neovascularización ocular, especialmente la ceguera diabética, retinopatías, principalmente retinopatía diabética o degeneración macular inducida por la edad y rubeosis; psoriasis, hemangioblastoma, tal como hemangioma; enfermedades inflamatorias renales, tales como glomerulonefritis, especialmente glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome urémico hemolítico, nefropatía diabética o nefrosclerosis hipertensiva; varias enfermedades inflamatorias, tales como artritis, especialmente artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, psoriasis, sarcoidosis, arteriosclerosis arterial y enfermedades que aparecen después de trasplantes, endometriosis o asma crónica y más de otras 70 enfermedades. Los nuevos vasos sanguíneos pueden alimentar los tejidos enfermos, destruir tejidos normales y, en el caso del cáncr, los nuevos vasos sanguíneos pueden permitir que las células tumorales se escapen en la circulación y se alojen en otros órganos (metástasis tumoral). La angiogénesis insuficiente aparece cuando hay un crecimiento inadecuado de vasos sanguíneos que contribuye al empeoramiento de un estado patológico, por ejemplo, en enfermedades, tales como enfermedad de arteria coronaria, apoplejía y curación de heridas retardadas. Además, las úlceras, apoplejías y ataques cardíacos pueden resultar de la ausencia angiogénesis que normalmente es necesaria para la curación natural. La presente invención contempla el tratamiento de los pacientes que tienen el riesgo de desarrollar las enfermedades mencionadas anteriormente.

[0120] Otros pacientes que son candidatos para recibir los antagonistas de STOP-1 de la presente invención presentan, o tienen el riesgo de desarrollar, la proliferación anormal de tejido fibrovascular, acné rosácea, síndrome de inmunodeficiencia adquirido, oclusión arterial, queratitis atópica, úlceras bacterianas, enfermedad de Bechet, tumores sanguíneos, enfermedad obstructiva de la carótida, neovascularización coroidal, inflamación crónica, desprendimiento retinal crónico, uveitis crónico, vitritis crónica, utilización en exceso de lentes de contacto, rechazo de injerto de córnea, neovascularización de córnea, neovascularización de injerto de córnea, enfermedad de Crohn, enfermedad de Eales, queratoconjuntivitis epidémica, úlceras fúngicas, infecciones de herpes simples, infecciones de herpes zoster, síndromes de hiperviscosidad, sarcoma de Kaposi, leucemia, degeneración lipídica, enfermedad Lyme, queratolisis marginal, úlcera de Mooren, infecciones por micobacterias diferentes de la lepra, miopia, enfermedad neovascular ocular, foveas ópticas, síndrome de Osler-Weber (Osler-Weber-Rendu), osteoartritis, enfermedad de Paget, pars planitis, pemfigoide, filectenulosis, poliartritis, complicaciones post-laser, infecciones por protozoos, pseudoxantoma elástico, pterigión, queratitis sicca, queratotomía radial, neovascularización retinal, retinopatía de premadurez, fibroplasias retrolental, sarcoide, escleritis, anemia de células falciformes, síndrome de Sjögren, tumores sólidos, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Stevens Johnson, queratitis límbica superior, sífilis, lupus sistémico, degeneración marginal de Terrien, toxoplasmosis, traumatismo, tumores de sarcoma de Ewing, tumores de neuroblastoma, tumores de osteosarcoma, tumores de retinoblastoma, tumores de rabdomiosarcoma, colitis ulcerosa, oclusión de venas, deficiencia de vitamina A y sarcoidosis de Wegener, angiogénesis no deseada asociada con diabetes,

enfermedades parasíticas, curación anormal de heridas, hipertrofia después de cirugía, lesión o traumatismo, inhibición del crecimiento capilar, inhibición de la ovulación y formación del corpus luteum, inhibición de implantes e inhibición del desarrollo de embriones en el útero.

5 [0121] Las terapias antiangiogénesis son útiles en el tratamiento general del rechazo de injerto, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, preeclampsia, efusión pericárdica, tal como la asociada con pericarditis, y efusión pleural, enfermedad y trastornos caracterizados por la permeabilidad vascular indeseable, por ejemplo, edema asociado con tumores cerebrales, ascitis asociada con tumores malignos, síndrome de Meigs, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, efusión pericárdica y efusión pleural, y similares.

10 [0122] Otras enfermedades dependientes de angiogénesis que se pueden tratar con las composiciones de la presente invención incluyen angiofibroma (sangre anormal de vasos que son propensos al sangrado), glaucoma neovascular (crecimiento anormal de vasos sanguíneos en el ojo), malformaciones arteriovenosas (comunicación anormal entre arterias y venas), fracturas no-unión (fracturas que no curarán), placas ateroscleróticas (endurecimiento de las arterias), granuloma piogénico (lesión común de piel compuesta de vasos sanguíneos), escleroderma (una forma de enfermedad de tejido conectivo), hemangioma (tumor compuesto de vasos sanguíneos), tracoma (causa principal de ceguera en el tercer mundo), articulaciones hemofílicas, adhesiones vasculares y cicatrices hipertróficas (formación anormal de cicatrices).

15 [0123] Dado que los vasos sanguíneos juegan un papel importante en la regulación del recambio óseo y el crecimiento, los potenciadores o agonistas según la presente invención pueden estimular o potenciar la reparación ósea y/o de cartílagos de la enfermedad o lesión o mediante el bloqueo de la inflamación o procesos de destrucción de tejido (actividad de colagenasa, actividad de osteoclastos, etc.) mediados por procesos inflamatorios. Las lesiones o enfermedades óseas a tratar con potenciadores o agonistas de STOP-1 de la presente invención incluyen enfermedades periodontales, otros procesos de reparación de dientes, osteoporosis y fracturas.

20 [0124] Un "agente de reconocimiento estromal" según la presente invención es un agente que reconoce sustancialmente y se une a tejido estromal en comparación con otro tejido. El tejido estromal es el almacén de tejido conectivo de un órgano, glándula u otra estructura, tal como se diferencia de los tejidos que realizan la función especial del órgano o parte. Entre los ejemplos de agentes de reconocimiento estromal se incluyen anticuerpos que se unen específicamente a FAP, fascina, HSP47, mesotelina y antígeno de células madre de próstata.

30 [0125] Un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención que "induce la muerte celular" es aquel que provoca que una célula viable se vuelva no viable. La célula es aquella que expresa un polipéptido STOP-1, preferiblemente una célula que sobreexpresa un polipéptido STOP-1 en comparación con una célula normal del mismo tipo de tejido. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. La muerte celular in vitro se puede determinar en ausencia de complemento y células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). De este modo, el ensayo para muerte celular se puede realizar utilizando suero inactivado con calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención es capaz de inducir la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de integridad de la membrana evaluada mediante la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)) o 7AAD en relación a células no tratadas. Los polipéptidos, anticuerpos, antagonistas o composiciones inductores de muerte celular preferidos son aquellos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

45 [0126] Una "célula que expresa STOP-1" es una célula que expresa un polipéptido STOP-1 endógeno o transfectado en la superficie celular o en una forma secretada. Un "cáncer que expresa STOP-1" es un cáncer que comprende células que tienen un polipéptido STOP-1 presente en la superficie celular o que producen y secretan un polipéptido STOP-1. En otra realización, un "cáncer que expresa STOP-1" produce opcionalmente y secreta niveles suficientes de polipéptido STOP-1, de manera que un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención se puede unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Un cáncer que "sobreexpresa" un polipéptido STOP-1 es aquel que tiene significativamente niveles más elevados de polipéptido STOP-1 en la superficie celular del mismo, o produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación de genes o por la transcripción o traducción incrementada. La sobreexpresión de polipéptido STOP-1 se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de niveles incrementados de la proteína STOP-1 presente en la superficie de una célula, o secretados por la célula (por ejemplo, a través de un ensayo de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-STOP-1 preparados contra un polipéptido STOP-1 que se puede preparar utilizando tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido STOP-1; análisis FACS, etc.). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el polipéptido STOP-1 o ARNm en la célula, por ejemplo, a través de la hibridación in situ fluorescente utilizando una sonda basada en ácido nucleico correspondiente a un ácido nucleico que codifica

STOP-1 o el complemento del mismo; (FISH; véase WO98/45479 publicada en octubre de 1998), técnicas de transferencia Southern, transferencia Northern, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR cuantitativa de tiempo real (RT-PCR). Se puede estudiar también la sobreexpresión del polipéptido STOP-1 midiendo el antígeno diseminado en un fluido biológico, tal como suero, por ejemplo, utilizando ensayos basados en anticuerpos (véase también, por ejemplo, la patente de Estados Unidos concedida el 12 de junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de abril de 1991; patente de Estados Unidos 5,401,638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, existen varios ensayos in vivo disponibles para el experto en la materia. Por ejemplo, se pueden exponer células en el cuerpo del mamífero a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a células en el mamífero, por ejemplo, mediante el rastreo externo para radioactividad o mediante el análisis de una biopsia tomada de un mamífero expuesto previamente al anticuerpo.

[0127] La palabra "marcador", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica para generar anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "marcados". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso del marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

[0128] El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, vinca alcaloides (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina ©, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos a continuación. A continuación, se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

[0129] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los agentes alquilantes tales como la tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; los alquilisulfonatos tales como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas tales como la benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; las etileniminas y metilamelaminas, incluyendo la altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lacona; lapacol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la briostatina; la calistatina; el CDC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofílico; teniposide; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; las mostazas nitrogenadas tales como el clorambucilo, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el hidrocloreto del óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitrosureas tales como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina, y la ranimustina; los antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gammall y la caliqueamicina omegall (véase, por ejemplo, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo de la neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adriamicina®) (incluyendo la morfolino-doxorubicina, la cianomorfolino-doxorubicina, la 2-pirrolino-doxorubicina y la desoxidoxorubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarubicina, la marcelomicina, las mitomicinas tales como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puomicina, la quelamicina, la rodorubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la zinostatina, la zorubicina; los anti-metabolitos tales como el metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico tales como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina tales como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina, la tioguanina; los análogos de pirimidina tales como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina, la floxuridina; los andrógenos tales como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitostanol, la mepitiostona, la testolactona; los anti-adrenales tales como la aminoglutetimida, el mitotano, el trilostano; los rellenos de ácido fólico tales como el ácido folínico; la aceglatona; el glicósido de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestabucilo; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquna; la elfomitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiurea; el lentinano; la lonidainina; los maitansinoides tales como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la

pentostatina; el fenameto; la pirarubicina; la losoxantrona; el ácido podofilínico; la 2-etilhidrazida; la procarbazona; el complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); la razoxana; la rizoxina; el sizofirano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquona; la 2,2',2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina; la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromano; la gacitosina; el arabinósido ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), formulación en nanopartículas de paclitaxel diseñado en albúmina, libre de Cremóforos ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y el doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); el cloranbucilo; la gemcitabina (Gemzar®); la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los análogos de platino tales como el cisplatino y carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina; la vinorelbina (Navelbine®); la novantrona; el tenipósido; edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; xeloda; el ibandronato; CPT-11; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides tales como el ácido retinoico; la capecitabina y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0130] También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir los efectos de hormonas en tumores, tales como antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógeno selectivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazolas, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo del 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en mecanismos de señalización implicados en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras; ribozimas, tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, la ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

[0131] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa STOP-1, *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan STOP-1 en la fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la mitosis en células.

[0132] "Doxorubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil) oxil]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

[0133] El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, utilización, dosis, administración, contraindicaciones y/o avisos con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

Tabla 1

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define      _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},

```

```

/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M,
0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M,
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};
/*
*/

```

```
#include <stdio.h>
```

```
#include <ctype.h>
```

```

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */

```

```

#define      DINS0      8      /* penalty for a gap */
#define      DINS1      1      /* penalty per base */
#define      PINS0      8      /* penalty for a gap */
#define      PINS1      4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short      n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short  x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};
/* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int      score;      /* score at last jmp */
    long      offset;    /* offset of prev block */
    short      ijmp;     /* current jmp index */
    struct jmp  jp;      /* list of jmps */
};

struct path {
    int      spc;      /* number of leading spaces */
    short  n[JMPSP];   /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPSP]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char      *ofile;      /* output file name */
char      *namex[2];   /* seq names: getseqs( ) */
char      *prog;       /* prog name for err msgs */
char      *seqx[2];    /* seqs: getseqs( ) */
int      dmax;         /* best diag: nw( ) */
int      dmax0;        /* final diag */
int      dna;          /* set if dna: main( ) */
int      endgaps;      /* set if penalizing end gaps */
int      gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int      len0, len1;   /* seq lens */
int      ngapx, ngapy; /* total size of gaps */

```

```

int          smax;          /* max score: nw( ) */
int          *xbm;          /* bitmap for matching */
long        offset;        /* current offset in jmp file */
struct diag  *dx;          /* holds diagonals */
struct path  pp[2];        /* holds path for seqs */

char        *calloc( ), *malloc( ), *index( ), *strcpy( );
char        *getseq( ), *g_calloc( );

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))

```

};

main(ac, av)

main

int ac;

char *av[];

{

prog = av[0];

if (ac != 3) {

fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);

fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");

fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");

fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");

fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");

exit(1);

}

namex[0] = av[1];

namex[1] = av[2];

seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);

seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);

xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */

ofile = "align.out"; /* output file */

nw(); /* fill in the matrix, get the possible jumps */

readjumps(); /* get the actual jumps */

print(); /* print stats, alignment */

cleanup(0); /* unlink any tmp files */

}

/* do the alignment, return best score: main()

```

* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/

```

```

nw( )

```

```

nw

```

```

{

```

```

    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int        *ndely, *dely; /* keep track of dely */
    int        ndelx, delx; /* keep track of delx */
    int        *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
    int        mis;            /* score for each type */
    int        ins0, ins1;     /* insertion penalties */
    register    id;             /* diagonal index */
    register    ij;            /* jmp index */
    register    *col0, *col1; /* score for curr, last row */
    register    xx, yy;        /* index into seqs */

```

```

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

```

```

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));

```

```

    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));

```

```

    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));

```

```

    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));

```

```

    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;

```

```

    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

```

```

    smax = -10000;

```

```

    if (endgaps) {

```

```

        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {

```

```

            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;

```

```

            ndely[yy] = yy;

```

```

        }

```

```

    col0[0] = 0;  /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
    if (endgaps) {
        if (xx == 1)
            col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
        else
            col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
        ndelx = xx;
    }
    else {
        col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
    }

    ...nw

    for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
            mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
            mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
        * favor new del over ongong del
        * ignore MAXGAP if weighting endgaps

```

```

*/
if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else {
        dely[yy] -= ins1;
        ndely[yy]++;
    }
} else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongong del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

```

```

}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

...nw

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);

```

```

        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
    }
}
dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
dx[id].jp.x[ij] = xx;
dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}
/*
*
```

```

* print( ) -- only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat( ) -- trace back best path, count matches: print( )
* pr_align( ) -- print alignment of described in array p[]: print( )
* dumpblock( ) -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align( )
* nums( ) -- put out a number line: dumpblock( )
* putline( ) -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock( )
* stars( ) -- put a line of stars: dumpblock( )
* stripname( ) -- strip any path and prefix from a seqname
*/

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print( )
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;

```

print

```

    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align( );
}
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
    int        nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char       outx[32];
    double     pct;
    register   n0, n1;
    register char *p0, *p1;

```

```

/* get total matches, score
*/
i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
n0 = pp[1].spc + 1;
n1 = pp[0].spc + 1;

nm = 0;
while ( *p0 && *p1 ) {
    if (siz0) {
        p1++;
        n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

/* pct homology:

```

```

* if penalizing endgaps, base is the shorter seq
* else, knock off overhangs and take shorter core
*/
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per
base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per
residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);

```

...getmat

```

    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars( ) */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(nameex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
    }
}
pr_align

```

```

nc[i] = 1;
ni[i] = 1;
siz[i] = ij[i] = 0;
ps[i] = seqx[i];
po[i] = out[i];          }
for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {                               ...pr_align
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
                 */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?

```

```

        */
        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
             * we need to merge all gaps
             * at this location
             */
            siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
            while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
        }
        ni[i]++;
    }
}

if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock( );
    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
    nn = 0;
}
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align( )
 */
static
dumpblock( )                                dumpblock
{
    register      i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

    (void) putc('\n', fx);
}

```

...dumpblock

```

    for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
            if (i == 0)
                nums(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                stars( );
            putline(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                fprintf(fx, star);
            if (i == 1)
                nums(i);
        }
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock( )
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;

```

```

        for (px = pn; j; j /= 10, px--)
            *px = j%10 + '0';
        if (i < 0)
            *px = '-';
    }
    else
        *pn = ' ';
    i++;
}
}
*pn = '\0';
nc[ix] = i;
for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void) putc(*pn, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

```

```

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock( )
 */

```

```
static
```

```
putline(ix)
```

```
    int    ix;          {
```

```
    int          i;
```

```
    register char *px;
```

```
    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
```

```
        (void) putc(*px, fx);
```

```
    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
```

```
        (void) putc(' ', fx);
```

```
    /* these count from 1:
```

putline

...putline

```

    * ni[] is current element (from 1)
    * nc[] is number at start of current line
    */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';

```

```

        else
            cx = ' ';
    }
    else
        cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align( )
 */
static
stripname(pn)
    char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;

    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

/*
 * cleanup( ) -- cleanup any tmp file
 * getseq( ) -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc( ) -- calloc( ) with error checkin

```

stripname

```

* readjumps( ) -- get the good jumps, from tmp file if necessary
* writejumps( ) -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw( )
*/
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX";      /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup( );                       /* cleanup tmp file */
long lseek( );

/*
* remove any tmp file if we blow
*/
cleanup(i)                            cleanup
{
    int i;

    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
* read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
* skip lines starting with ';', '<', or '>'
* seq in upper or lower case
*/
char *
getseq(file, len)                    getseq
{
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */

    char line[1024], *pseq;

```

```

register char *px, *py;
int          natgc, tlen;
FILE         *fp;

if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
    exit(1);
}
tlen = natgc = 0;
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++)
        if (isupper(*px) || islower(*px))
            tlen++;
}
if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: malloc( ) failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6,
file);
    exit(1);
}
pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

...getseq

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;

```

```

        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU",*(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
    char *msg;          /* program, calling routine */
    int nx, sz;          /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg,
nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                            readjmps

```

```

{
    int      fd = -1;
    int      siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open( ) %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }

    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

            if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset,
sizeof(dx[dmax].offset));
                dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
            }
            else
                break;
        }

        if (i >= JMPS) {
            fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
            cleanup(1);
        }

        if (j >= 0) {
            siz = dx[dmax].jp.n[j];
            xx = dx[dmax].jp.x[j];
            ...readjumps
        }
    }
}

```

```

    dmax += siz;
    if (siz < 0) {          /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}

else
    break;
}

/* reverse the order of jmps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {

```

```

        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;    }
}

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw( )
 */
writejumps(ix)                                writejumps
{
    int    ix;

    char    *mktemp( );

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp( ) %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }

    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

Tabla 2

STOP-1	XXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

5 % de identidad en la secuencia de aminoácidos = (el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido STOP-1) = 5 dividido por 15 = 33,3%

Tabla 3

STOP-1	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

10 % de identidad en la secuencia de aminoácidos = (el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido STOP-1) = 5 dividido por 10 = 50%

Tabla 4

STOP-1-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

15 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos = (el número de nucleótidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de PRO-DNA) = 6 dividido por 14 = 42,9%

Tabla 5

STOP-1-DNA	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)

20 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos = (el número de nucleótidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de PRO-ADN) = 4 dividido por 12 = 33,3%

Composiciones y métodos de la invención

Variantes del polipéptido STOP-1

25 [0134] Además de los polipéptidos STOP-1 de secuencia nativa y de longitud completa aquí descritos, se contempla que se pueden preparar variantes de polipéptido STOP-1. Las variantes de polipéptido STOP-1 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de STOP-1 y/o mediante la síntesis del polipéptido STOP-1 deseado. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del polipéptido STOP-1, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclamiento a la

30 membrana.

35 [0135] Las variaciones en el polipéptido STOP-1 de secuencia nativa y longitud completa o en varios dominios del polipéptido STOP-1 aquí descrito, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido STOP-1 que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido STOP-1 en comparación con el polipéptido STOP-1 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del polipéptido STOP-1. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar,

sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del polipéptido STOP-1 con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tienen una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y analizando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

[0136] En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales denominados "ejemplos de sustituciones" en la Tabla 6 o, tal como se describe posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y se criban los productos.

Tabla 6

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Substituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu;	glu
Cys(C)	ser;	ser
Gln(Q)	asn;	asn
Glu(E)	asp;	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu(L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[0137] Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del polipéptido STOP-1 se realizan mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener: (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: asn; gln; his, lys, arg;
- 5 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0138] Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados)

- 10 [0139] Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para fabricar el ADN variante del STOP-1 se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter et al., Nucl. Acids. Res., 13: 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids. Res., 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells et al., Gene, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

- 15 [0140] El análisis de aminoácidos por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos relativamente pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido de este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

25 Modificaciones de polipéptidos STOP-1

- [0141] Las modificaciones covalentes de polipéptidos STOP-1 se incluyen en el alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un polipéptido STOP-1 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del polipéptido STOP-1. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular el polipéptido STOP-1 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-STOP-1, y viceversa. Entre los agentes entrecruzadores utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditiol]propioimidato.

- 30 [0142] Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

- 40 [0143] Otro tipo de modificación covalente del polipéptido STOP-1 incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en el polipéptido STOP-1 de secuencia nativa (mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido STOP-1 de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

- 50 [0144] La adición de sitios de glicosilación al polipéptido STOP-1 se puede realizar convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina al polipéptido STOP-1 de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos del polipéptido STOP-1 puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que

codifica el polipéptido STOP-1 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0145] Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido STOP-1 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981).

[0146] La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido STOP-1 se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglucosilación química son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, et. al. Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge, et al. Anal. Biochem., 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato en los polipéptidos se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura et al. Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

[0147] Otro tipo de modificación covalente del polipéptido STOP-1 comprende la unión del polipéptido STOP-1 a uno del conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxiálquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

[0148] El polipéptido STOP-1 también se pueden modificar de una manera que forme moléculas quiméricas que comprenden un polipéptido STOP-1 fusionados a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

[0149] En un ejemplo, dicha molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido STOP-1 con un dominio de transducción de proteína que dirige el polipéptido STOP-1 para la liberación a varios tejidos y más particularmente a través de la barrera hemato encefálica, utilizando, por ejemplo, el dominio de transducción de proteína de la proteína TAT del virus de inmunodeficiencia humana (Schwarze et al., 1999, Science 285: 1569-72).

[0150] En otro ejemplo, dicha molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido STOP-1 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo-etiqueta se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del polipéptido STOP-1. La presencia de dichas formas epítipo etiquetadas del polipéptido STOP-1 se puede detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo etiqueta permite que el polipéptido STOP-1 se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítipo de α -tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

[0151] En un ejemplo alternativo, la molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido STOP-1 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de la molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen polipéptidos que comprenden aproximadamente o solamente los residuos 94-243, los residuos 33-53 o los residuos 33-52 de STOP-1 humana en lugar de como mínimom una región variable en una molécula Ig.

[0152] Preferiblemente, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH₂ y CH₃, o la bisagra, regiones CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de Estados Unidos No. 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

Preparación de polipéptido STOP-1

[0153] La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de polipéptidos STOP-1 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica los polipéptidos STOP-1. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar el polipéptido STOP-1. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido STOP-1, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida. Véase, por ejemplo, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por

ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente por separado varias partes del polipéptido STOP-1 y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido STOP-1 de longitud completa.

Selección y transformación de células huésped

[0154] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente invención para la producción del polipéptido STOP-1 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un experto en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., supra.

[0155] Los procedimientos de transfección son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, tratamiento con CaPO_4 y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook et al., supra, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen et al., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown et al., Methods in enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour et al., Nature, 336. 348-352 (1988).

[0156] Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. Coli*. Varias cepas de *E. Coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. Coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. Coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. Coli* W3110 (ATCC 27.325) y cepa de *E. Coli* K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. Coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La Cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa de huésped habitual para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. Coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. Coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. Coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; la cepa de *E. Coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa de *E. Coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. Coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

[0157] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el polipéptido STOP-1. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt et al. J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna et al., J. Basic. Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces*

occidentalis (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionada del género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylophils, 269 (1982).

[0158] Las células huésped adecuadas para la expresión de ácido nucleico que codifica polipéptidos STOP-1 glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles se incluyen ovario de hámster chino (CHO) y células COS. Ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se estima que está en la capacidad de la técnica.

Selección y utilización de un vector replicable

[0159] El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica un polipéptido o anticuerpo de la presente invención se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el sector. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un experto en la materia.

[0160] El polipéptido o anticuerpo de la presente invención se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido o anticuerpo que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de secuencias líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo las secuencias líder del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o la secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans* glucoamilasa (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como secuencias líderes secretoras virales.

[0161] Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levadura, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura, y orígenes virales varios (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

[0162] Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[0163] Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el polipéptido o anticuerpo, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su

utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

5 [0164] Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido o anticuerpo de la presente invención para dirigir la síntesis de ARNm. Son conocidos promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)],
10 fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido o anticuerpo de la presente invención.

15 [0165] Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] u otros enzimas glucolíticos [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

20 [0166] Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen en detalle en EP 73.657.

30 [0167] La transcripción del ácido nucleico a partir de vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del polio, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

35 [0168] Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica un polipéptido o anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente se conocen muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en la cara tardía del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante de un polipéptido o anticuerpo de la presente invención, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' con respecto al promotor.

45 [0169] Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el polipéptido o anticuerpo.

50 [0170] En Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen adicionalmente otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del polipéptido o anticuerpo de la presente invención en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

Detección de la amplificación/expresión génica

55 [0171] La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias

proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN, dobles cadenas híbridas de ADN-ARN o dobles cadenas de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la doble cadena está unida a una superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos a la doble cadena.

[0172] La expresión génica, alternativamente, se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y el ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero o se pueden sintetizar (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la presente invención). Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido STOP-1 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN que codifica el polipéptido STOP-1 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

Purificación de polipéptidos STOP-1

[0173] Las formas de polipéptidos STOP-1 se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisados de células huésped. Si están unidos a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido STOP-1 se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o agentes para lisar células. Según una realización, se puede desear purificar el polipéptido STOP-1 a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefarsa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítipo del polipéptido STOP-1. Se pueden utilizar varios métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el polipéptido STOP-1 concreto producido. Según una realización, los polipéptidos STOP-1 se purifican mediante cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo de la presente invención.

Ensayo de la inhibición de la proliferación celular

[0174] La actividad inhibidora de antagonistas de la presente invención se puede medir utilizando los ensayos de los ejemplos 13-14 siguientes y otros ensayos conocidos en la técnica.

[0175] Los modelos animales de tumores y cánceres (por ejemplo, ccáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, etc) incluyen animales tanto recombinantes (transgénicos) como no recombinantes. Los modelos de animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos murinos. Dichos modelos se pueden generar mediante la introducción de células tumorales en ratones singeneicos utilizando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en vena de cola, implante en el bazo, implante intraperitoneal, implante bajo la cápsula renal o implante de "orthopin", por ejemplo, células de cáncer de colon implantadas en tejido colónico. Ver, por ejemplo, publicación de PCT No. WO 97/33551, publicada en 18 de septiembre de 1997). Probablemente, las especies animales utilizadas más frecuentemente en estudios oncológicos son ratones inmunodeficientes y, en particular, ratones desnudos. La observación de que el ratón desnudo con hipoaplasia tímica podría actuar de manera satisfactoria como un huésped para xenoinjertos de tumores humanos ha conducido a su amplio uso para este objetivo. El gen autosómico recesivo se ha introducido en un gran número de cepas congénicas distintas de ratón desnudo, incluyendo, por ejemplo, ASW, A/He, AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, I/st, NC, NFR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII y SJL. Además, se han desarrollado una gran variedad de otros animales con defectos inmunológicos heredados diferentes del ratón desnudo y se han utilizado como receptores de xenoinjertos de tumores. Para más detalles, ver, por ejemplo, *The Nude Mouse in Oncology Research*, E. Boven y B. Winograd, eds., (CRC Press, Inc., 1991).

[0176] Las células introducidas en dichos animales pueden derivarse de tumores/líneas de células cancerosas conocidas, tales como cualquiera de las líneas celulares de tumores indicados anteriormente y, por ejemplo, la línea celular B104-1-1 (línea celular NIH-3T3 estable transfectada con el protooncogén neu); células NIH-3T3 transfectadas con ras; Caco-2 (ATCC HTB-37); o una línea celular de adenocarcinoma de colon humano de grado II moderadamente bien diferenciada, HT-29 (ATCC HTB-38); o de tumores y cáncres. Las muestras de células tumorales o cancerosas se pueden obtener de pacientes que experimentan cirugía, utilizando

condiciones estándar que implican congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido. Karmali et al., *Br. J. Cancer*, 48: 689-696 (1983).

[0177] Las células tumorales se pueden introducir en animals, tales como ratones desnudos, mediante una variedad de procedimientos. El espacio subcutáneo (s.c.) en ratones es muy adecuado para el implante de tumores. Los tumores se pueden transplantar s.c. como bloques sólidos, como biopsias con aguja mediante la utilización de un trocar o como suspensiones celulares. Para el implante de bloques sólidos o trocates, se introducen fragmentos de tejido tumoral de tamaño adecuado en el espacio s.c. Las suspensiones celulares se preparan frescos a partir de tumores primarios o líneas de células tumorales estables y se inyectan subcutáneamente. Las células tumorales también se pueden inyectar como implantes subdérmicos. En esta localización, el inóculo se deposita entre la parte inferior del tejido conector dérmico y el tejido s.c.

[0178] Se pueden generar modelos de animals de cáncer de mama, por ejemplo, mediante el implante de células de neuroblastoma de rata (de las cuales se aisló inicialmente el oncogén neu) o células NIH-3T3 transformadas con neu en ratones desnudos, esencialmente tal como se describe por Drebin et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83: 9129-9133 (1986).

[0179] De manera similar, los modelos animals de cáncer de colon se pueden generar mediante el paso de células de cáncer de colon en animales, por ejemplo, ratones desnudos, conduciendo a la aparición de tumores en estos animales. Se ha descrito un modelo de transplante ortotópico de cáncer de colon humano en ratones desnudos, por ejemplo, por Wang et al., *Cancer Research*, 54: 4726-4728 (1994) y Too et al., *Cancer Research*, 55: 681-684 (1995). Este modelo se basa en el denominado "METAMOUSE™" vendido por AntiCancer, Inc., (San Diego, California).

[0180] Los tumores que aparecen en animals se pueden extraer y cultivar in vitro. Las células de los cultivos in vitro se pueden entonces pasar a animales. Dichos tumores pueden servir como dianas para el análisis posterior o el cribado de fármacos. Alternativamente, Los tumores que resultan del pasaje se pueden aislar y se pueden analizar el ARN de las células antes del pasaje y las células aisladas después de una o más rondas por la expresión diferencial de los genes de interés. Dichas técnicas de pasaje se pueden realizar con cualquier tumor o líneas de células cancerosas conocidas.

[0181] Por ejemplo, Meth A, CMS4, CMS5, CMS21, y WEHI-164 son fibrosarcomas inducidos químicamente de ratones hembra BALB/c (DeLeo et al., *J. Exp. Med.*, 146: 720 (1977)), que proporcionan un sistema de modelo altamente controlable para estudiar actividades antitumorales de varios agentes. Palladino et al., *J. Immunol.*, 138: 4023-4032 (1987). Brevemente, las células tumorales se propagan in vitro en cultivo celular. Antes de la inyección en los animals, las líneas celulares se lavan y suspenden en tampón, a una densidad celular de aproximadamente 10×10^6 a 10×10^7 células/ml. A continuación, los animals se infectan subcutáneamente con 10 a 100 μ l de la suspensión celular, permitiendo de una a tres semanas para que aparezca un tumor.

[0182] Además, se puede utilizar como modelo de tumor para investigación el carcinoma de pulmón de Lewis (3LL) de ratones, que es uno de los tumores experimentales más ampliamente estudiados. La eficacia en este modelo tumoral se ha correlacionado con los efectos beneficiosos en el tratamiento de pacientes humanos diagnosticados con carcinoma de célula pequeña de pulmón (SCCL). Este tumor se puede introducir en ratones normales tras la inyección de fragmentos de tumores de un ratón afectado o de células mantenidas en cultivo Zupi et al., *Br. J. Cancer*, 41, suppl. 4:309 (1980). La evidencia indica que los tumores pueden iniciarse a partir de la inyección de incluso una única célula y que una proporción muy elevada de células tumorales infectadas sobreviven. Para más información sobre este modelo tumoral, ver, Zacharski, *Haemostasis*, 16: 300-320 (1986).

[0183] Una manera de evaluar la eficacia de un compuesto de prueba en un modelo de animal con un tumor implantado es medir el tamaño del tumor antes y después del tratamiento. Tradicionalmente, el tamaño de los tumores implantados se ha medido con un pie de rey en dos o tres dimensiones. La medición limitada a dos dimensiones no refleja con precisión el tamaño del tumor, por lo tanto, se convierte habitualmente en el correspondiente volumen mediante la utilización de una fórmula matemática. Sin embargo, la medición del tamaño del tumor es muy imprecisa. Los efectos terapéuticos de un fármaco candidato se pueden describir mejor como un retraso del crecimiento inducido por el tratamiento y un retraso del crecimiento específico. Otra variable importante en la descripción del crecimiento del tumor es el tiempo de duplicación del volumen del tumor. También están disponibles programas informáticos para el cálculo y la descripción del crecimiento tumoral, tales como el programa descrito por Rygaard y Spang-Thomsen, *Proc. 6th Int. Workshop in Immune-Deficient Animals*, Wu y Sheng eds., (Basilea, 1989), p. 301. Sin embargo, se indica que la necrosis y las respuestas inflamatorias que siguen al tratamiento pueden realmente dar lugar a un incremento en el tamaño tumoral, al menos inicialmente. Por lo tanto, estos cambios deben monitorizarse cuidadosamente mediante una combinación de un método morfométrico y análisis citométrico de flujo.

[0184] Además, los modelos de animales recombinantes (transgénicos) se pueden diseñar mediante la introducción de la parte codificante del gen de STOP-1 identificado en la presente invención en el genoma de animales de interés, utilizando técnicas estándar para producir animales transgénicos. Entre los animals que pueden servir como diana para la manipulación transgénica se incluyen, sin limitación, ratones, ratas, conejos,

cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, chimpancés y monos. Las técnicas conocidas en el sector para introducir un transgén en dichos animales incluyen microinyección pronucleica (Patente de Estados Unidos No. 4.873.181); transferencia de genes mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6148-615 [1985]); marcaje de genes en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, *Cell*, 56: 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo, *Mol. Cell. Biol.*, 3: 1803-1814 [1983]); transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano *et al.*, *Cell*, 57: 717-73 [1989]). Para una revisión, ver por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 4.736.866

[0185] Para los objetivos de la presente invención, los animales transgénicos incluyen aquellos que transportan el transgén sólo en parte de sus células ("animales mosaico"). El transgén se puede integrar como un transgén individual, o en concatámeros, por ejemplo, los tándems cabeza con cabeza o cabeza con cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula concreta también es posible mediante, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6232-636 (1992). La expresión del transgén en animales transgénicos se puede monitorizar mediante técnicas estándar. Por ejemplo, el análisis de transferencia Southern o la amplificación por PCR se pueden utilizar para verificar la integración del transgén. El nivel de la expresión de ARNm se puede analizar a continuación utilizando técnicas, tales como hibridación *in situ*, análisis de transferencia Northern, PCR o inmunocitoquímica. Los animales se examinan en profundidad para hallar signos del desarrollo de tumores o cáncer.

[0186] Alternativamente, se pueden construir animales "knock out" que presentan un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido STOP-1 aquí identificado, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido STOP-1 y el ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, se puede utilizar ADNc que codifica un polipéptido STOP-1 particular para clonar ADN genómico que codifica ese polipéptido según técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica un polipéptido STOP-1 particular se puede eliminar o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en ambos extremos 5' y 3'). Véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en que el ADN introducido se ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992). A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de agregación. Véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL: Oxford, 1987), pp. 113-152. A continuación, se pueden implantar embriones quiméricos en un animal de adopción hembra pseudopreñado adecuado y el embrión nace para crear un animal "knock-out". La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y se utiliza para criar animales en que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knockout se pueden caracterizar, por ejemplo, por su estabilidad para defenderse contra ciertas enfermedad patológicas y por su desarrollo de patologías debido a la ausencia del polipéptido STOP-1.

[0187] La eficacia de los anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos STOP-1 identificados en la presente invención y a otros fármacos candidatos, se pueden probar también en el tratamiento de tumores animales espontáneos. Una diana adecuada para dichos estudios es el carcinoma de células escamosas (SCC) oral felino. El SCC oral felino es un tumor maligno altamente invasivo que es el tumor oral de gatos más habitual, representando sobre un 60% de los tumores orales observados en estas especies. Raramente se produce metástasis a puntos distantes, aunque esta baja incidencia de metástasis puede ser simplemente un reflejo de los tiempos de supervivencia cortos para gatos con este tumor. Estos tumores no son susceptibles habitualmente de cirugía, principalmente debido a la anatomía de la cavidad oral felina. Actualmente, no existe un tratamiento eficaz para este tumor. Antes de entrar en estudio, cada gato experimenta un examen clínico completo, biopsia, y se escanea mediante tomografía computerizada (CT). Los gatos diagnosticados con tumores de células escamosas orales sublinguales están excluidos del estudio. La lengua se puede paralizar como resultado de dicho tumor e incluso si el tratamiento mata el tumor, los animales no son capaces de alimentarse por sí mismos. Cada gato se trata repetidamente, durante un periodo de tiempo más largo. Las fotografías de los tumores se tomarán diariamente durante el periodo de tratamiento, y en cada posterior chequeo. Después del tratamiento, cada gato experimenta otra exploración CT. Desde este momento, las exploraciones CT y los radiogramas torácicos se evalúan cada 8 semanas. En los datos se evalúan las diferencias en la supervivencia, respuesta y toxicidad en comparación con los grupos de control. Una respuesta positiva puede requerir la evidencia de una regresión tumoral, preferiblemente con una mejora de la calidad de vida y/o aumento de la esperanza de vida.

[0188] Además, también se pueden analizar otros tumores animales espontáneos, tales como fibrosarcoma, adenocarcinoma, linfoma, condroma, o leiomioma de perros, gatos y babuinos. De estos, el adenocarcinoma mamario en perros y gatos es un modelo preferido ya que su apariencia y comportamiento son muy similares a los de los humanos. Sin embargo, la utilización de este modelo está limitado por la rara aparición de este tipo de tumor en animales.

Ensayos para la evaluación de actividad angiogénica o vasculogénica

[0189] Los ensayos que son útiles para medir la actividad proangiogénica, antiangiogénica, provasculogénica o antivascurológica de los agonistas, progenitores, antagonistas de la presente invención incluyen los ensayos de los ejemplos 14 y 26 u otros ensayos conocidos en la técnica, tales como los incluidos a continuación.

- 5 [0190] Los ensayos para la actividad de curación de heridas incluyen por ejemplo, los descritos en Winter, Epidermal Wound Healing, Maibach, HI and Rovee, DT, eds. (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago), pp. 71-112, modificado por el artículo de Eaglstein y Mertz, J. Invest. Dermatol., 71: 382-384 (1978).

[0191] Los ensayos para la proliferación de células endoteliales incluyen por ejemplo, los descritos en WO 02/00690 o la publicación de la patente de Estados Unidos No. 20010036955A1.

- 10 [0192] Los ensayos para la evaluación de la inhibición de angiogénesis incluyen, por ejemplo, el ensayo descrito en la publicación de patente de Estados Unidos No. 20010036955A1.

[0193] Los ensayos para medir la inhibición de la formación de tubos endoteliales incluyen, por ejemplo, el ensayo descrito en la publicación de patentes de Estados Unidos No. 20010036955A1.

Estudios de unión a anticuerpos

- 15 [0194] Los estudios de unión a anticuerpo se pueden llevar a cabo utilizando métodos de ensayo conocidos, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directo e indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc., 1987), pp.147-158.

- [0195] Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado de competir con el analito de muestra de prueba para la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos se inculubilizan antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos se pueden separar de manera conveniente del patrón y el analito que permanecen no unidos.
- 20

- [0196] Los ensayos sandwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítopo, de la proteína a detectar. En un ensayo de sandwich, el analito de muestra de prueba es unido por un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido y, posteriormente, un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4,376,110. El segundo anticuerpo se puede marcar en sí mismo con un grupo detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un grupo detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es una enzima.
- 25
- 30

[0197] Los ensayos de ELISA competitivo se pueden realizar para cribar polipéptidos, anticuerpos o antagonistas para los que se unen específicamente a STOP-1, cuya unión se puede inhibir por un anticuerpo monoclonal de la presente invención.

- 35 [0198] En un ejemplo, se pueden realizar un ensayo ELISA competitivo siguiendo los métodos descritos en los ejemplos (por ejemplo, el ejemplo 22). Se puede recubrir una forma de longitud completa o forma corta de proteína STOP-1 nativa (2 ug/ml en PBS) en una placa de microtitulación a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se pueden bloquear mediante la adición de 65 ul de BSA al 1% durante 30 minutos seguido de 40 ul de Tween20 al 1% durante otros 30 minutos. A continuación, los pocillos se pueden lavar con PBS – Tween20 al 0,05% 5 veces. Se pueden incubar varias concentraciones de anticuerpo S7, S16, S4, F15 o S9 (en tampón ELISA) en los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se pueden añadir los polipéptidos o anticuerpos a analizar a pocillos diferentes durante 10 minutos a una concentración que normalmente produciría el 90% de capacidad de unión en ausencia del anticuerpo S7, S16, S4, F15 o S9. A continuación, los pocillos se pueden lavar con PBS – Tween20 al 0,05% 5 veces. La unión se puede cuantificar mediante métodos conocidos en el sector.
- 40
- 45

[0199] Para inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser fresca o congelada o se puede embeber en parafina y fijarse con conservante, tal como formalina, por ejemplo.

Ensayos de tumores basados en células

- 50 [0200] Se pueden utilizar ensayos basados en células y modelos de animales para trastornos proliferativos, tales como tumores, para verificar la actividad inhibidora de los antagonistas de la presente invención. Los ensayos basados en células, modelos de animales y métodos útiles incluyen, por ejemplo, los indicados en los ejemplos siguientes.

[0201] Por ejemplo, las células de un tipo de célula conocida por estar implicada en un trastorno proliferativo se transfectan con ADNc de STOP-1 en la presente invención y se analiza la capacidad de estos ADNc para inducir

el crecimiento excesivo o inhibir el crecimiento en presencia o ausencia de un antagonista. Si el trastorno proliferativo es cáncer, las células tumorales adecuadas incluyen, por ejemplo, líneas de células tumorales estables, tales como la línea de células B104-1-1 (línea celular NIH-3T3 estable transfectada con el protooncogén neu) y células NIH-3T3 transfectadas con ras, que se pueden transfectar con una secuencia STOP-1 y monitorizar para el crecimiento tumorigénico. Dichas líneas celulares transfectadas se pueden utilizar entonces para analizar la capacidad de anticuerpos policlonales o monoclonales o composiciones de anticuerpos para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas al ejercer actividad citostática o citotóxica en el crecimiento de las células transformadas, o al mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0202] Además, se pueden utilizar cultivos primarios derivados de tumores en animales transgénicos (tal como se describe anteriormente) en los ensayos basados en células en la presente invención, aunque se prefieren las líneas celulares estables. Las técnicas para derivar líneas celulares continuas de animales transgénicos son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Small et al., Mol. Cell. Biol., 5: 642-648 (1985).

Terapia génica

[0203] A continuación, se describen métodos y composiciones mediante los cuales se pueden mejorar los síntomas de la enfermedad. Los polipéptidos STOP-1 (incluyendo variantes de polipéptido STOP-1) descritos aquí, antagonistas y anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar según la presente invención mediante la expresión de cada uno in vivo, que a menudo se refiere como terapia génica. Por ejemplo, las variantes del polipéptido STOP-1 se pueden expresar en células utilizando estos métodos. Según una realización, los métodos o los vectores utilizados para expresar los polipéptidos STOP-1 (incluyendo variantes) implican la utilización de un agente de reconocimiento estromal para dirigir el vehículo que contiene el polipéptido UNQ o molécula de ácido nucleico a una región estromal deseada.

[0204] Existen dos estrategias principales para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células de un mamífero: in vivo y ex vivo. Para una liberación in vivo, el ácido nucleico se inyecta directamente en el mamífero, normalmente en los sitios en los que se requiere el polipéptido STOP-1, es decir, el sitio de síntesis del polipéptido STOP-1, si se conoce, y el sitio (por ejemplo, herida) en el que se necesita la actividad biológica del polipéptido STOP-1. Para el tratamiento ex vivo, se extraen células del mamífero, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas, y las células modificadas se administran al mamífero directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que son implantadas en el mamífero (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 4,892,538 y 5,283,187). Existen una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas in vitro, o se transfieren in vivo en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero in vitro incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. La transducción implica la asociación de una partícula viral (preferiblemente retroviral) recombinante defectuosa en la replicación con un receptor celular, seguido de la introducción de los ácidos nucleicos contenidos por la partícula en la célula. Un vector utilizado normalmente para la liberación ex vivo del gen es un retrovirus.

[0205] Entre las técnicas actuales de transferencia de ácido nucleico *in vivo* preferidas se incluyen la transfección con vectores virales o no virales (tales como adenovirus, virus del herpes simplex I, o virus adenoasociados (AAV)) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol; véase, por ejemplo, Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996)). Dichos vectores se utilizan para sintetizar virus que se pueden utilizar como vehículos para agentes de liberación, tales como antagonistas y moléculas de ácido nucleico de la presente invención. Los vectores más preferidos para utilizar en terapia génica son virus, más preferiblemente adenovirus, AAV, lentivirus, o retrovirus. Un vector viral, tal como un vector retroviral, incluye por lo menos un promotor/potenciador transcripcional o elemento u elementos que definen el locus, u otros elementos que controlan la expresión génica mediante otros medios, tales como el corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear o modificación post-traducciona del mensajero. Además, un vector viral, tal como un vector retroviral, incluye una molécula de ácido nucleico que, cuando se transcribe en presencia de un gen que codifica el polipéptido STOP-1, está unido operativamente al mismo y actúa como secuencia de inicio de la traducción. Dichas construcciones de vectores también incluyen una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) o partes de las mismas, y sitios de unión a cebador de cadena positiva y negativa apropiados al virus utilizado (si éstos no están ya en presentes en el vector viral). Además, dicho vector incluye habitualmente una secuencia señal para la secreción del polipéptido STOP-1 de una célula huésped en la que está situada. Preferiblemente, la secuencia señal para este objetivo es una secuencia señal de mamífero, más preferiblemente la secuencia señal nativa para el polipéptido STOP-1. Opcionalmente, la construcción de vectores también pueden incluir una señal que dirige la poliadenilación, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. A modo de ejemplo, dichos vectores incluirán habitualmente una 5' LTR, un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de síntesis de ADN de segunda cadena y una 3' LTR o una parte de la misma. Se pueden utilizar otros vectores que son no virales, tales como lípidos catiónicos, polilisina y dendrímeros. Según una realización, el vehículo tiene un agente de reconocimiento estromal.

[0206] En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácidos nucleicos con un agente que reconoce las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se utilizan liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con la endocitosis para reconocer y/o facilitar la captación, por ejemplo, de proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan la internalización en el ciclado, y proteínas que dirigen la localización intracelular y aumentan la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987); and Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3410-3414 (1990). Para una revisión del marcaje de genes actualmente conocidos y los protocolos de terapia génica, véase, Anderson et al., Science, 256: 808-813 (1992). Véase también WO93/25673 y las referencias citadas en la misma.

[0207] La terapia génica y métodos adecuados para producir partículas retrovirales y proteínas estructurales se pueden hallar en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.681.746.

Detección de mutaciones de STOP-1

[0208] La presente invención también se refiere a la utilización del gen que codifica el polipéptido STOP-1 como diagnóstico. La detección de una forma mutada del polipéptido STOP-1 puede ser indicativa de una propensión a desarrollar un trastorno proliferativo. La detección de niveles del polipéptido STOP-1 en el tejido de un mamífero sobre los niveles del mismo tejido en un mamífero normal también puede ser indicativa de la propensión del desarrollo de un trastorno proliferativo (a continuación).

[0209] Los individuos que portan mutaciones en los genes que codifican un polipéptido STOP-1 humano se pueden detectar a nivel de ADN mediante una variedad de técnicas. Los ácidos nucleicos para el diagnóstico se pueden obtener de células de mamífero, tales como de sangre, orina, saliva, biopsias de tejido y material de autopsia. El ADN genómico se puede utilizar directamente para la detección o se puede amplificar enzimáticamente mediante la utilización de PCR (Saiki et al., Nature, 324: 163-166 (1986)) antes del análisis. El ARN o ADNc también se puede utilizar para el mismo objetivo. Como ejemplo, los cebadores de PCR complementarios al ácido nucleico que codifica el polipéptido STOP-1 se pueden utilizar para identificar y analizar las mutaciones del polipéptido STOP-1. Por ejemplo, se pueden detectar las delecciones e inserciones mediante un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales se pueden identificar mediante la hibridación de ADN amplificado a ARN radiomarcado que codifica el polipéptido STOP-1 o alternativamente, secuencias de ADN antisentido radiomarcado que codifican el polipéptido STOP-1. Las secuencias que se emparejan perfectamente se pueden diferenciar de las dobles cadenas que no se emparejan mediante digestión de ARNasa A o mediante diferencias en las temperaturas de fusión.

[0210] El análisis genético basado en las diferencias de secuencias de ADN se puede conseguir mediante la detección de la alteración en movilidad electroforética de fragmentos de ADN en geles con o sin agentes desnaturizantes. Pequeñas delecciones e inserciones de secuencia se pueden visualizar mediante electroforesis en gel de alta resolución. Los fragmentos de ADN de secuencias diferentes se pueden diferenciar en geles de gradiente de formamida desnaturizante en que las movilidades de fragmentos de ADN diferentes se retrasan en el gel en diferentes posiciones según las temperaturas de fusión específica o parcial. Véase, por ejemplo, Myers et al., Science, 230: 1242 (1985).

[0211] Los cambios de secuencia en localizaciones específicas también se pueden revelar mediante ensayos de protección de nucleasa, tales como protección de ARNasa o S1 o el método de separación química, por ejemplo, Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4397-4401 (1985).

[0212] De este modo, la detección de una secuencia de ADN específica se puede conseguir mediante métodos, tales como la hibridación, protección de ARNasa, separación química, secuencias de ADN directa o la utilización de enzimas de restricción, por ejemplo, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), y transferencia Southern de ADN genómico.

[0213] Además de la electroforesis en gel y secuenciación de ADN más convencional, las mutaciones en el polipéptido STOP-1 también se pueden detectar mediante análisis in situ.

Detección de los niveles de polipéptido o ácidos nucleicos de STOP-1

[0214] Se pueden detectar niveles de moléculas de polipéptido o ácido nucleico de STOP-1, por ejemplo, utilizando los reactivos descritos aquí en combinación con métodos conocidos en la técnica, tal como hibridación in situ, RT-PCR, transferencias northern, transferencias western o mediante la utilización de los ejemplos y reactivos aquí proporcionados.

[0215] Se puede utilizar un ensayo de competición en el que se unen anticuerpos específicos para el polipéptido STOP-1 a un soporte sólido y se pasan el polipéptido STOP-1 marcado y una muestra derivada del huésped

sobre el soporte sólido y se puede correlacionar la cantidad de marcador detectado unido al soporte sólido a una cantidad del polipéptido STOP-1 en la muestra.

[0216] En una realización preferente, los anticuerpos que se unen específicamente a STOP-1 descrito aquí se utilizan para monitorizar los niveles de proteína STOP-1

5 Ensayos de cribado para fármacos candidatos

[0217] Se describen aquí métodos de cribado de compuestos para identificar aquellos que mimetizan la actividad del polipéptido STOP-1 (agonistas) o evitan el efecto del polipéptido STOP-1 (antagonistas). En general, el polipéptido STOP-1 se expone al fármaco candidato mediante incubación o contacto bajo varias condiciones. Se diseñan ensayos de cribado para fármacos candidatos antagonistas para identificar compuestos que se unen específicamente o se coplejan con el polipéptido STOP-1 nativo. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar fármacos candidatos de molécula pequeña.

[0218] Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, que incluyen ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos, y ensayos basados en células en combinación con el polipéptido STOP-1, fragmentos del mismo, o células que expresan el polipéptido STOP-1 o fragmentos del mismo.

[0219] Todos los ensayos para antagonistas tienen en común que requieren el contacto del candidato fármaco con un polipéptido STOP-1 codificado por un ácido nucleico identificado aquí bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que interaccionen estos dos componentes.

[0220] En los ensayos de interacción, la interacción es la unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. Por ejemplo, la unión de polipéptido STOP-1 a una célula cancerosa o una célula endotelial en ausencia o presencia del antagonista candidato se puede realizar en los ensayos descritos en los ejemplos siguientes para evaluar si el antagonista bloqueaba la unión de STOP-1 a las células. En otra realización, el polipéptido STOP-1 codificado por el gen identificado aquí o el fármaco candidato se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente se realiza en general mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido STOP-1 y el secado. Alternativamente, se puede utilizar un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido STOP-1 a inmovilizar para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del componente no inmovilizado, el cual puede estar marcado por un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción es completa, los componentes no reaccionados se extraen, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección de marcador inmovilizado en la superficie indica que tiene lugar la complejación. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la complejación, por ejemplo, mediante la utilización de un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

[0221] Si el compuesto candidato interacciona con, pero no se une, a un polipéptido STOP-1 particular, su interacción con ese polipéptido se puede analizar mediante los métodos conocidos para detectar las interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, coimmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden monitorizar mediante la utilización de un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y Song, *Nature* (London), 340: 245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991)) tal como se describe por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, el otro que funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levadura descrito en las publicaciones anteriores (referido en general como el "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad y utiliza dos proteínas híbridas, una en que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y la otra, en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 a través de interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos de interacción se detectan con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. En Clontech está comercialmente disponible un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos. Este sistema también se puede extender al mapeo de dominios de proteínas implicados en interacciones de proteínas específicas, así como localizar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0222] Los compuestos que interfieren con la unión entre un polipéptido STOP-1 y otra proteína, que incluyen otro polipéptido STOP-1 se puede analizar de la siguiente manera: normalmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el polipéptido STOP-1 y otra proteína bajo condiciones y durante un tiempo que permite la

interacción y la unión de las dos proteínas. Para analizar la capacidad de un compuesto candidato de inhibir la unión, la reacción se desarrolla en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción para servir como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el otro polipéptido presente en la mezcla se monitoriza tal como se ha descrito anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del polipéptido STOP-1 y el otro polipéptido.

[0223] En un ensayo de proliferación, el polipéptido STOP-1 tiene la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales en presencia del comitígeno ConA. Específicamente, las células endoteliales de vena umbilical humana se pueden obtener y cultivar en placas de cultivo de base plana de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) y complementar con una mezcla de reacción apropiada para facilitar la proliferación de las células, conteniendo la mezcla Con-A (Calbiochem, La Jolla, CA). Se añaden Con-A y el compuesto inhibidor de prueba a cribar y después de la incubación a 37°C, los cultivos se pulsan con 3-H-timidina y se recogen sobre filtros de fibras de vidrio (pH; Cambridge Technology, Watertown, MA). La incorporación promedio de 3-H-timidina (cpm) de cultivos por triplicado se determina utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments, Irvine, CA). La incorporación significativa de 3-(H)-timidina indica la estimulación de la proliferación de células endoteliales.

[0224] Según una realización, el ensayo o ensayos descritos anteriormente en los ejemplos siguientes se realizan para probar antagonistas de la presente invención. Alternativamente, los antagonistas se pueden detectar mediante la combinación del polipéptido STOP-1 y un potencial antagonista con polipéptido STOP-1 frío bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido STOP-1 se puede marcar, tal como mediante radioactividad o método colorimétrico, de manera que el número de moléculas polipeptídicas de STOP-1 unidas se pueden utilizar para determinar la eficacia del antagonista potencial. El polipéptido STOP-1 se puede marcar mediante un conjunto de medios que incluyen la yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio. Después de la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a análisis autoradiográfico.

[0225] Los fármacos candidatos incluyen anticuerpos anti-STOP-1 que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones químicas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un fármaco candidato puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido STOP-1 que inhibe competitivamente la acción del polipéptido STOP-1.

Protocolos de administración, pautas, dosis y formulaciones

[0226] Las moléculas de la presente invención y los antagonistas de las mismas son farmacéuticamente útiles como agentes profilácticos y terapéuticos para varios trastornos y enfermedades indicadas anteriormente.

[0227] Las composiciones terapéuticas de los polipéptidos, anticuerpos o antagonistas de la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando la molécula deseada que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de soluciones acuosas o formulaciones liofilizadas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

[0228] Entre los ejemplos adicionales de dichos portadores se incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicérido de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogeno fosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, y polietilenglicol. Los portadores para formas tópicas o basadas en gel de agonista o antagonista incluyen polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa de sodio o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliácridatos, polímeros en bloque de polioxitileno-polioxiopropileno, polietilenglicol, y alcoholes de cera de madera. Para todas las administraciones, se utilizan de forma adecuada

formas de depósito convencionales. Dichas formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, apósitos, formas de inhalación, pulverizadores nasales, comprimidos sublinguales y preparaciones de liberación controlada. Los polipéptidos STOP-1 o agonistas o antagonistas se formularán habitualmente en dichos vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

- 5 [0229] Otra formulación comprende la incorporación de un polipéptido STOP-1 o agonista o antagonista del mismo en artículos conformados. Dichos artículos se pueden utilizar en la modulación del crecimiento celular endotelial y la angiogénesis. Además, la invasión tumoral y la metástasis se pueden modular con estos artículos.

[0230] Los polipéptidos STOP-1 o agonistas o antagonistas a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución. Los polipéptidos STOP-1 se almacenarán normalmente en forma liofilizada o en solución si se administran de manera sistémica. Si está en forma liofilizada, el polipéptido STOP-1 o agonista o antagonista del mismo, se formulan habitualmente en combinación con otros ingredientes para la reconstitución con un diluyente apropiado en el momento del uso. Un ejemplo de una formulación líquida de un polipéptido STOP-1 o agonista o antagonista es una solución no conservada, incolora, clara y estéril rellena en un vial de una dosis para inyección subcutánea. Las composiciones farmacéuticas conservadas adecuadas para el uso repetido pueden contener, por ejemplo, dependiente principalmente de la patología y el tipo de polipéptido:

- a. polipéptido STOP-1 o agonista o antagonista del mismo;
- b. un tampon capaz de mantener el pH en un intervalo de estabilidad máxima del polipéptido u otra molécula en solución, preferiblemente aproximadamente 4-8;
- 20 c. un detergente/surfactante principalmente para estabilizar el polipéptido o molécula contra la agregación inducida por agitación;
- d. un isotonicador;
- e. un conservante seleccionado del grupo de fenol, alcohol bencílico y haluro de bencetonio, por ejemplo, cloruro; y
- 25 f. agua.

[0231] Si el detergente utilizado es no iónico, puede ser, por ejemplo, polisorbatos (por ejemplo, POLYSORBATE™ (TWEEN™) 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, POLOXAMER™ 188). La utilización de surfactantes no iónicos permite que la formulación se exponga a tensiones de superficie de cizalla sin causar desnaturalización del polipéptido. Además, dichas formulaciones que contienen surfactantes se pueden utilizar en dispositivos aerosoles, tales como los utilizados en una dosificación pulmonar, y pistolas de inyección a chorros sin aguja (véase, por ejemplo, EP 257,956).

[0232] Puede estar presente un isotonicador para asegurar la isotonicidad de una composición líquida del polipéptido STOP-1 o agonista o antagonista del mismo, e incluye alcoholes de azúcares polihídricos, preferiblemente alcoholes de azúcares trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol. Estos alcoholes de azúcares se pueden utilizar solos o combinados. Alternativamente, se puede utilizar cloruro de sodio u otras sales inorgánicas apropiadas para hacer que las soluciones sean isotónicas.

[0233] El tampón puede ser, por ejemplo, tampón acetato, citrato, succinato o fosfato dependiendo del pH deseado. El pH de un tipo de formulación líquida de la presente invención se tampona en el intervalo de aproximadamente 4 a 8, preferiblemente aproximadamente pH fisiológico.

[0234] Los conservantes fenol, alcohol bencílico y haluros de bencetonio, por ejemplo, cloruro, con agentes antimicrobianos conocidos que se pueden utilizar.

[0235] Las composiciones terapéuticas de polipéptido o anticuerpo de STOP-1 se colocan en general en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica. Las formulaciones se administran preferiblemente como inyecciones intravenosas (i.v.), subcutáneas (s.c.) o intramusculares (i.m.) repetidas o como formulaciones de aerosoles adecuadas para la liberación intranasal o intrapulmonar (para la liberación intrapulmonar, véase EP 257,956).

[0236] Los polipéptidos o anticuerpos de STOP-1 también se pueden administrar en forma de preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la proteína, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) tal como se describe por Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)

o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables (Langer et al., supra), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988).

[0237] Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el organismo durante un periodo de tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que da lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización de las proteínas dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de un intercambio tiodisulfuro, puede conseguirse la estabilización modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

[0238] Las composiciones de polipéptido y anticuerpo de STOP-1 de liberación controlada también incluyen polipéptidos de STOP-1 a atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen el polipéptido STOP-1 se preparan mediante métodos conocidos per se: DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes de Estados Unidos Nos. 4,485,045 y 4,544,545; y EP 102,324. Normalmente, los liposomas son del tipo unilameral pequeñas (aproximadamente 200-800 Angstroms) en que el contenido de lípido es superior a aproximadamente el 30% molar de colesterol, ajustándose la proporción seleccionadas a la terapia óptima.

[0239] La dosis terapéuticamente eficaz de un polipéptido STOP-1 o antagonista del mismo variará, naturalmente, dependiendo de factores, tales como el trastorno proliferativo a tratar (incluyendo prevención), el método de administración, el tipo de compuesto utilizado para el tratamiento, cualquier coterapia involucrada, la edad, peso, condición médica general, historial médico del paciente, etc., y su determinación es bien conocida en la práctica de un médico. Por consiguiente, será necesario para el terapeuta titular la dosificación y modificar la ruta de administración según se requiere para obtener el efecto terapéutico máximo. El médico administrará el polipéptido STOP-1 o antagonista hasta conseguir una dosis que consigue el efecto deseado para el tratamiento de la patología en cuestión. Por ejemplo, si el objetivo es el tratamiento del cáncer, la cantidad sería la que inhibe el crecimiento del cáncer.

[0240] Con las directrices anteriores, la dosis eficaz se encuentra en general en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 mg/kg, más preferiblemente aproximadamente 0,01-1,0 mg/kg, lo más preferiblemente aproximadamente 0,01-0,1 mg/kg.

[0241] Para la utilización no oral en el tratamiento de trastornos proliferativos, es ventajoso administrar el polipéptido STOP-1 o antagonista del mismo en forma de una inyección a aproximadamente 0,01 a 50 mg, preferiblemente aproximadamente 0,05 a 20 mg, lo más preferiblemente 1 a 20 mg, por kg de peso corporal, 1 a 3 veces diarias mediante inyección intravenosa. Para la administración oral, una molécula basada en el polipéptido STOP-1 se administra preferiblemente a aproximadamente 5 mg a 1 g, preferiblemente aproximadamente 10 a 100 mg, por kg de peso corporal, 1 a 3 veces diarias. Debe entenderse que la contaminación de endotoxinas debe mantenerse mínima a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Además, para la administración humana, las formulaciones preferiblemente cumplen con la esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requerida por las normas de FDA Office and Biologics.

[0242] La pauta de dosificación de una composición farmacéutica que contiene el polipéptido STOP-1 a utilizar en la regeneración de tejidos se determinará por el médico considerando varios factores que modifican la acción de los polipéptidos, por ejemplo, la cantidad de peso de tejido que se desea formar, el sitio del daño, la condición del tejido dañado, el tamaño de la herida, el tipo de tejido dañado (por ejemplo, hueso), la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración, y otros factores clínicos. La dosis puede variar con el tipo de matriz utilizada en la reconstitución y con inclusión de otras proteínas en la composición farmacéutica. Por ejemplo, la adición de otros factores de crecimiento conocidos, tales como IGF-I, a la composición final también puede afectar a la dosis. El progreso se puede monitorizar mediante la valoración periódica de crecimiento y/o reparación de tejido/hueso, por ejemplo, rayos X, determinaciones histomorfométricas, y el marcaje con tetraciclina.

[0243] La ruta de administración de polipéptido STOP-1 o antagonista o agonista es de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, mediante inyección o perfusión mediante rutas intravenosa, intramuscular, intracerebral, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraocular, intraarticular, intratecal, oral, tópica, o por inhalación o mediante sistemas de liberación controlada tal como se indica a continuación. El polipéptido STOP-1 o agonista o antagonistas del mismo también se pueden administrar de manera adecuada mediante las rutas intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales, así como

sistémicos. La ruta intraperitoneal se espera que sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores ováricos.

[0244] Si se utiliza un péptido o molécula pequeña como antagonista o agonista, preferiblemente se administra por vía oral o no oral en forma de un líquido o sólido a mamíferos.

5 [0245] Entre los ejemplos de sales farmacológicamente aceptables de moléculas que forman sales y son útiles aquí se incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo, sal de sodio, sal de potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sal de calcio, sal de magnesio), sales de amonio, sales de base orgánica (por ejemplo, sal de piridina, sal de trietilamina), sales de ácidos inorgánicos (por ejemplo, clorhidrato, sulfato, nitrato), y sales de ácido orgánico (por ejemplo, acetato, oxalato, p-toluenosulfonato).

10 [0246] Para composiciones de la presente invención que son útiles para la regeneración de hueso, cartílago, tendón o ligamento, el método terapéutico incluye la administración de la composición de manera tópica, sistémica o local como implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para utilizar está en una forma libre de pirógenos fisiológicamente aceptable. Además, la composición de manera deseable se puede encapsular o inyectar en una forma viscosa para liberar al sitio del daño óseo, de cartílago o tejido. La administración tópica puede ser adecuada para la curación de heridas o la reparación de tejidos.

15 Preferiblemente, para la formación de hueso y/o cartílago, la composición incluiría una matriz capaz de liberar la composición que contiene proteína al sitio del daño óseo y/o de cartílago, proporcionando una estructura para el desarrollo de hueso y cartílago y preferiblemente capaz de reabsorberse en el cuerpo. Dichas matrices pueden estar formadas de materiales actualmente utilizados para otras aplicaciones médicas implantadas.

20 [0247] La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética, y propiedades de la interfase. La aplicación particular de las composiciones definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser biodegradables y sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatita, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y polianhídrido definidos químicamente. Otros materiales potenciales son biodegradables y están biológicamente definidos, tales como

25 hueso o colágeno dérmico. Otras matrices comprenden proteínas puras o componentes de matrices extracelulares. Otras matrices potenciales son no biodegradables y definidas químicamente, tales como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otros cerámicos. Las matrices pueden estar comprendidas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato de tricalcio. Los biocerámicos se pueden alterar en la composición, tales como

30 en el fosfato de calcio y aluminio y el procesamiento para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

[0248] Una realización específica es un copolímero 50:50 (peso molar) de ácido láctico y ácido glicólico en forma de partículas porosas que tienen diámetros que varían de 150 a 800 micras. En algunas aplicaciones será útil para utilizar un agente secuestrante, tal como carboximetilcelulosa o coágulos de sangre autólogos, para evitar

35 que las composiciones de polipéptidos se disocien de la matriz.

[0249] Una familia adecuada de agentes secuestrantes son materiales celulósicos, tales como alquilcelulosas (que incluyen hidroxialquilcelulosas), que incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y carboximetilcelulosa, siendo el preferido sales catiónicas de carboximetilcelulosa (CMC). Otros agentes secuestrantes preferidos incluyen ácido hialurónico, alginato de sodio

40 polietilenglicol, óxido de polioxitileno, polímero de carboxivinilo y polivinilalcohol. La cantidad de agente secuestrante de la invención es de 0,5-20 % en peso, preferiblemente 1-10 % en peso, en base al peso total de formulación, que representa la cantidad necesaria para evitar la desorción del polipéptido (o su antagonista) de la matriz polimérica y para proporcionar la manipulación apropiada de la composición, aunque no tanto para que las células progenitoras eviten la infiltración de la matriz, proporcionando así al polipéptido (o su antagonista) la

45 oportunidad de ayudar en la actividad osteogénica de las células progenitoras.

Terapias de combinación

[0250] La eficacia del polipéptido STOP-1 o un agonista o antagonista del mismo en la prevención o tratamiento del trastorno en cuestión se puede mejorar mediante la administración del agente activo en serie o combinado con otro agente que es eficaz para estos objetivos, ya sea en la misma composición o como composiciones

50 separadas.

[0251] Por ejemplo, para el tratamiento de trastornos proliferativos, la terapia con antagonista de polipéptido STOP-1 se puede combinar con la administración de otros inhibidores de proliferación celular, tales como agentes citotóxicos.

[0252] Además, los antagonistas del polipéptido STOP-1 utilizados para tratar el cáncer se pueden combinar con

55 agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o inhibidores del crecimiento identificados anteriormente. Además, para el tratamiento del cáncer, el antagonista del polipéptido STOP-1 se administra de forma adecuada en serie o combinado con tratamientos radiológicos, ya impliquen radiación o administración de sustancias radioactivas.

[0253] Si el tratamiento es para el cáncer, puede ser deseable también administrar anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumor, tales como anticuerpos que se unen a uno o más de los receptores de ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o VEGF. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos diferentes aquí descritos. Algunas veces, puede ser beneficioso también administrar una o más citoquinas al paciente. En una realización preferida, los anticuerpos antagonistas de la presente invención se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar primero, seguido de un anticuerpo antagonista de la presente invención. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o administración del anticuerpo antagonista de la presente invención primero. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas utilizadas actualmente y pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo de la presente invención.

[0254] En una realización, la vascularización de los tumores se ataca en terapia combinada. Los anticuerpos antagonistas de la presente invención y otro anticuerpo (por ejemplo., anti-VEGF) se administran a pacientes con tumores a dosis terapéuticamente eficaces determinadas, por ejemplo, mediante la observación de la necrosis del tumor o sus focos metastásicos, si los hay. Esta terapia se continúa hasta el punto en que no se observa ningún efecto beneficioso adicional o el examen clínico no muestra restos del tumor o cualquier foco metastásico. A continuación, se administra TNF, solo o combinado con un agente auxiliar, tal como alfa, beta o gamma-interferón, anticuerpo anti-Her2, heregulina, anticuerpo anti-heregulina, factor D, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina 2 (IL-2), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), o agentes que inducen la coagulación microvascular en tumores, tales como anticuerpo anti-proteína C, anticuerpo anti-proteína S o proteína de unión a C4b (véase, WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), o calor o radiación.

[0255] Las cantidades eficaces de los agentes terapéuticos administrados en combinación con el polipéptido STOP-1 o antagonista del mismo será a discreción del médico o veterinario. La administración y ajuste de la dosis se realizan para conseguir el máximo tratamiento de las patologías a tratar. La dosis dependerá adicionalmente de factores, tales como el tipo de agente terapéutico a utilizar y el paciente específico a tratar. Habitualmente, la cantidad utilizada será la misma dosis que la utilizada si el agente terapéutico determinado se administra sin el polipéptido STOP-1.

Artículos de fabricación

[0256] Un artículo de fabricación, tal como un kit que contiene el polipéptido STOP-1 o agonistas o antagonistas del mismo, útiles para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos anteriormente comprende por lo menos un recipiente y una etiqueta. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el diagnóstico o tratamiento de la patología y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el polipéptido STOP-1 o un agonista o antagonista del mismo. La etiqueta en o asociado con el recipiente indica que la composición se utiliza para el diagnóstico o tratamiento de la patología de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas y prospectos con instrucciones para su uso. El artículo de fabricación también puede comprender un segundo o tercer recipiente con otro agente activo tal como se ha descrito anteriormente.

Anticuerpos policlonales

[0257] Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos en la técnica. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido STOP-1 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, pero sin limitación, la hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar se incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A o trehalosa dicorinomicolat sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin gran experimentación.

Anticuerpos monoclonales

[0258] Los anticuerpos anti-STOP-1 pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, utilizando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (patente de Estados

Unidos No. 4,816,567) o se pueden producir mediante los métodos aquí descritos en la sección de ejemplos. En un método de hibridoma, se inmuniza habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

[0259] El agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido STOP-1 o una proteína de fusión del mismo. En general, se utiliza cualquier linfocito de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o células de bazo o células de nódulo linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. A continuación, se fusionan los linfocitos con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)). Las líneas celulares inmortalizadas son normalmente células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de roedor, origen bovino y origen humano. Normalmente, se utiliza líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

[0260] Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, soportan la expresión estable a nivel elevado de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63.

[0261] Se analiza el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido STOP-1. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en el sector. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Sctachard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

[0262] Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar. Goding, supra. Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio Medio de Eagle modificado por Dulbecco o medio RPM1-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como fluido ascítico en un mamífero.

[0263] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos de purificación convencionales de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

[0264] Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos No. 4,816,567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden aislar fácilmente y secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison et al., supra) o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de todo o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

[0265] Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier

punto en la región Fc para prevenir la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

[0266] Los métodos in vitro también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, se puede realizar utilizando técnicas conocidas en el sector.

Anticuerpos humanos y humanizados

[0267] Los anticuerpos anti-STOP-1 pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una CDR del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón ("framework") de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado preferiblemente también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332 : 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

[0268] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de CDRs o CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0269] Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de inmunoglobulina endógena en la producción. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362, 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); y las Patentes de Estados Unidos 5.545.806, 5.569.825 y 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.547.807; y WO 97/17852. Alternativamente, los anticuerpos humanos se pueden fabricar introduciendo los locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en que los genes de inmunoglobulina endógena han sido inactivados de manera parcial o completa. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos que se parecen estrechamente a los observados en humanos en todos los aspecto, incluyendo la redistribución de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, para las patentes de Estados Unidos Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

[0270] Alternativamente, la tecnología de expresión de fagos (McCafferty et al., *Nature* 348, 552-553 [1990]) se puede utilizar para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de

cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De este modo, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión ver, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

[0271] Tal como se ha descrito anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos por células B activadas *in vivo* (véase las Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

[0272] Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector, que incluyen las bibliotecas de expresión en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos. Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991).

Anticuerpos biespecíficos anti-STOP-1

[0273] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el polipéptido STOP-1, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína de la superficie celular o receptor o subunidad de receptor. Por ejemplo, la proteína de la superficie celular puede ser un receptor de células asesinas naturales (NK). De este modo, según una realización, un anticuerpo biespecífico de la presente invención se puede unir a STOP-1 y unir a una célula NK y, opcionalmente, activar la célula NK. Según otra realización, un anticuerpo biespecífico de la presente invención se puede unir a STOP-1 y se une a un tejido estromal en comparación con otros tejidos (por ejemplo, agente de reconocimiento estromal).

[0274] Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades. Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. En WO 93/08829 publicada el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

[0275] Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (C_H1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para más detalles de generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

[0276] Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0277] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Anticuerpos heteroconjugados

[0278] Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360: WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980.

Diseño de la función efectora

[0279] Se puede desear modificar el anticuerpo de la presente invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de aumentar, por ejemplo, la efectividad del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se puede introducir un residuo o residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad antitumoral aumentada también se pueden preparar utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf et al. *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis por complemento y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989).

Inmunoconjugados

[0280] La presente invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0281] Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse se incluyen, la cadena A de la difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Están disponibles diversos radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

[0282] Pueden fabricarse conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)-propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobezoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina con ricina tal como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[0283] En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el prerreconocimiento de tumores en la que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la extracción del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente depurador y a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Inmunoliposomas

[0284] Los anticuerpos aquí descritos se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); y las

patentes de Estados Unidos Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con un tiempo de circulación aumentado se describen en la patente de Estados Unidos No. 5,013,556.

[0285] Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivado con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas descritos en Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente el liposoma contiene un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina). Véase, Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

10 Composiciones farmacéuticas de anticuerpos

[0286] Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido STOP-1 identificado aquí, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos aquí anteriormente, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos indicados anterior y posteriormente en forma de composiciones farmacéuticas.

[0287] Se pueden utilizar lipofectinas o liposomas para liberar los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico, anticuerpos, antagonistas o composición de la presente invención en células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de proteína diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o se pueden producir mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

[0288] La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concreta a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente que aumenta su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

[0289] Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0290] Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0291] Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metakrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el organismo durante un periodo de tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que da lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de un intercambio tiodisulfuro, puede conseguirse la estabilización modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Métodos de tratamiento utilizando el anticuerpo anti-STOP-1

[0292] Se contempla que los anticuerpos para un polipéptido STOP-1 se puede utilizar para tratar varios trastornos proliferativos y enfermedades complicadas o relacionadas con la angiogénesis indicadas anteriormente.

[0293] Los anticuerpos se administran a un mamífero, preferiblemente un humano, según métodos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante perfusión continua durante un periodo de tiempo, mediante ruta intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. La administración intravenosa del anticuerpo es preferida.

[0294] Se pueden combinar otras pautas terapéuticas con la administración de los anticuerpos de la presente invención tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, si los anticuerpos son para tratar cáncer, el paciente a tratar con dichos anticuerpos también puede recibir terapia por radiación. Alternativamente, o adicionalmente, se puede administrar un agente quimioterapéutico al paciente. La preparación y pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o tal como se determina empíricamente por el experto en la materia. La preparación y las pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service, Ed., M.C. Perry (Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del anticuerpo, o se pueden administrar simultáneamente con el mismo. El anticuerpo se puede combinar con un compuesto anti-estrógeno, tal como tamoxifeno o EVISTA™ o un agente anti-progesterona, tal como onapristona (véase, EP 616812) en dosis conocidas para dichas moléculas.

[0295] Si los anticuerpos se utilizan en el tratamiento para el cáncer, pueden administrarse, opcionalmente, con anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumor, tales como anticuerpos que se unen a uno o más de los receptores de ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o VEGF. Éstos también incluyen los agentes indicados anteriormente. Además, el anticuerpo se administra de manera adecuada en serie o combinado con tratamientos radiológicos, ya impliquen radiación o la administración de sustancias radioactivas. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos diferentes aquí descritos. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar primero, seguido de un anticuerpo antagonista de la presente invención. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o administración del anticuerpo de la presente invención primero. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas utilizadas actualmente y pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo de la presente invención.

[0296] En una realización, la vascularización de los tumores se ataca en terapia combinada. El anticuerpo anti-polipéptido STOP-1 y otro anticuerpo (por ejemplo., anti-VEGF) se administran a pacientes con tumores a dosis terapéuticamente eficaces determinadas, por ejemplo, mediante la observación de la necrosis del tumor o sus focos metastásicos, si los hay. Esta terapia se continúa hasta el punto en que no se observa ningún efecto beneficioso adicional o el examen clínico no muestra restos del tumor o cualquier foco metastásico. A continuación, se administra TNF, solo o combinado con un agente auxiliar, tal como alfa, beta o gamma-interferón, anticuerpo anti-Her2, heregulina, anticuerpo anti-heregulina, factor D, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina 2 (IL-2), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), o agentes que inducen la coagulación microvascular en tumores (tales como anticuerpo anti-proteína C, anticuerpo anti-proteína S o proteína de unión a C4b, véase, WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), o calor o radiación.

[0297] Dado que los agentes auxiliares variarán en su eficacia, puede ser deseable comparar su impacto en el tumor mediante el cribado en matrices de forma convencional. La administración de anticuerpo anti-polipéptido STOP-1 y TNF se repite hasta conseguir el efecto clínico deseado. Alternativamente, el anticuerpo anti-polipéptido STOP-1 se administra junto con TNF y, opcionalmente, un agente o agentes auxiliares. En los casos en que se hallan tumores sólidos en las extremidades o en otras localizaciones susceptibles de aislamiento de la circulación general, los agentes terapéuticos aquí descritos se administran al tumor u órgano aislado. En otras realizaciones, un antagonista de FGF o PDGF, tal como un anticuerpo neutralizante anti-FGF o anti-PDGF, se administra al paciente conjuntamente con el anticuerpo anti-polipéptido STOP-1. El tratamiento con anticuerpos anti-polipéptido STOP-1 preferiblemente se puede suspender durante periodos de curación de heridas o neovascularización deseable.

[0298] Para la prevención o el tratamiento de un trastorno proliferativo, la dosis apropiada de un anticuerpo de la presente invención dependerá del tipo de trastorno a tratar, tal como se define anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, historial clínico del paciente y respuesta la anticuerpo y la discreción del médico. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

[0299] Por ejemplo, dependiendo del tipo y gravedad del trastorno, aproximadamente de 1 ug/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante perfusión continua. Una dosis diaria o semanal típica podría variar de aproximadamente 1 ug/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la patología, el tratamiento se repite o mantiene hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas del trastorno. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza

fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales, incluyendo, por ejemplo, obtención de imágenes radiográficas de tumores.

Artículos de fabricación con anticuerpos

5 [0300] También se proporciona un artículo de fabricación que contiene un recipiente con el anticuerpo y un marcador. Dichos artículos se describen anteriormente, en los que el agente activo es un anticuerpo anti-STOP-1.

Diagnóstico y pronóstico de tumores utilizando anticuerpos

10 [0301] Si la patología por la que se utilizan los anticuerpos es el cáncer, aunque las proteínas de la superficie celular, tales como los receptores de crecimiento, se sobreexpresan en ciertos tumores, son dianas excelentes para fármacos candidatos o el tratamiento de tumores (por ejemplo, cáncer), las mismas proteínas junto con los polipéptidos STOP-1 son útiles adicionalmente en el diagnóstico y pronóstico de tumores. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos STOP-1 como agentes de diagnóstico o pronóstico de tumores.

15 [0302] Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, para detectar cualitativa o cuantitativamente la expresión de genes que incluyen el gen que codifica el polipéptido STOP-1. El anticuerpo está equipado preferiblemente con un marcador detectable, por ejemplo fluorescente, y la unión se puede monitorizar mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en el sector. Dichos ensayos de unión se realizan esencialmente tal como se describe anteriormente.

20 [0303] La detección in situ de unión del anticuerpo a los productos génicos marcadores se puede realizar, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Para este objetivo, se extrae una muestra histológica del paciente y se aplica un anticuerpo marcado a la misma, preferiblemente mediante el cubrimiento del anticuerpo en una muestra biológica. Este procedimiento también permite determinar la distribución del producto génico marcador en el tejido examinado. Será evidente para los expertos en la materia que una amplia variedad de métodos histológicos están fácilmente disponibles para la detección in situ.

25 [0304] Estos depósitos se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. Los depósitos estarán disponibles mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, lo que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo de los depósitos al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según las mismas (incluyendo 37 CFR

30

35 § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

[0305] El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en los depósitos muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente remplazados en una notificación por otro igual. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

40

[0306] Los reactivos disponibles comercialmente referidos en los ejemplos se utilizaron según las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de estas células identificada en los siguientes ejemplos y a lo largo de la memoria mediante los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA. A menos que se indique lo contrario, la presente invención utiliza procedimientos estándar de tecnología de ADN recombinante, tales como los descritos aquí anteriormente y en los siguientes libros de texto: Sambrook et al., supra; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications

45

(Academic Press, Inc.: N.Y., 1990); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991.

50

[0307] A lo largo de la memoria y las reivindicaciones, la palabra "comprender" o variaciones tal como "comprende" o "que comprende" se entenderá que implica un número entero o grupo de números enteros indicados, pero sin la exclusión de cualquier otros número entero o grupo de números enteros.

55 [0308] La descripción escrita anterior se considera que es suficiente para permitir que un experto en la materia realice la invención. Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos únicamente, y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de

las mostradas y descritas aquí serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encuentran en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Ejemplo 1 - STOP-1 se conserva en la evolución

- 5 [0309] Las moléculas de ácido nucleico que contiene STOP-1 de humano, ratón y pez cebra se obtuvieron mediante la utilización de PCR. Las secuencias con homología a STOP-1 de humano, ratón y pez cebra se pueden hallar en la base de datos Genbank de EST de ratón: AK003674; EST de pollo: A1585129, AL585130; EST de pez del arroz: BJ490431, BJ498080, BJ510203, BJ504730; y EST de pez cebra: AL727874, AW595388; y HGT AL844521. Las secuencias de aminoácidos de STOP-1 humana, de ratón, pez del arroz, pez cebra y pollo se describen en las SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6, y 7, respectivamente, y la figura 1. Los ADNc de STOP-1 humana se depositaron bajo los términos del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA tal como se describe a continuación:

Especies	Material	Depósito No.	Fecha de depósito
Humana	76393-1664	203323	6 Octubre de 1998
Humana	h762HIP	PTA-5019	21 febrero 2003

- 15 [0310] La alineación de aminoácidos de STOP-1 entre varias especies de vertebrados superiores (humano, ratón, pollo, peces cebra y del arroz) muestra un grado elevado de conservación, en particular, partes del dominio C-terminal que incluye el dominio de triple hélice (figura 1). En la secuencia de consenso, un asterisco indica residuos conservados en todas las especies. Un círculo negro indica residuos que se conservan en la mayoría de las especies.
- 20 [0311] La figura 2 muestra una proteína STOP-1 humana. La secuencia encuadrada indica el sitio de separación por señal. El dominio de triple hélice está subrayado.

Ejemplo 2 - STOP-1 se sobreexpresa en tumores

- 25 [0312] Se analizó una base de datos privada que contenía información de la expresión génica de microarrays (GeneExpress®, GeneLogic Inc., Gaithersburg, MD) para la expresión de ARNm de STOP-1 en varios tumores (análisis BLIST, software privado escrito y desarrollado en Genentech, Inc. para utilizar con la base de datos GeneExpress®). Algunos de los tipos de tejidos analizados incluían: adiposo, adrenal, vasos sanguíneos, hueso, mama, cuello uterino, SNC, endometrio colorrectal, esófago, vesícula biliar, cabeza y cuello, corazón, tejido hematopoyético, riñón, hígado, pulmón, tejido linfóide, músculo, miometrio, tejido euroendocrino, ovario, páncreas, próstata, piel, intestino delgado, tejido blando, estómago, testículo, timo, tiroides y tejidos urinarios y normales (mama, colon, pulmón, ovario y riñón). Se observó que los niveles de ARNm de STOP-1 eran especialmente elevados en tumores de hueso, mama, cuello uterino, colorrectal, endometrio, esófago, glioma, cabeza y cuello, riñón, pulmón, euroendocrino, ovario, páncreas, piel, tejido blando, estómago, tiroides y urinario.

- 30 [0313] Los niveles de expresión de ARN también se determinaron mediante amplificación con transcripción inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la diana específica, (SEQ ID NO:1), en ARN total de una variedad de tumores y tejidos normales (mama, colon, pulmón, ovario y riñón). Los tejidos se obtuvieron por el departamento de patología de Genentech y el ARN se preparó mediante centrifugación con cloruro de cesio.

- 35 [0314] Las reacciones de amplificación por RT-PCR de una etapa consistían en 10x tampón A (Applied Biosystems), 10 Unidades de inhibidor de ARNasa, 200 uM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5 mM MgCl₂, 1,25 Unidades de Taq Gold Polimerasa, 25 unidades de transcriptasa inversa MULV (PE Biosystems), 50 ng de ARN total, 200 nM de sonda de hibridación específica de gen (FAM-CATCCAGTAGAAGCATCTCCTTTTGGGTAA-TAMRA) (SEQ ID NO:23), 300 nM de cebador directo específico de gen (GGGTTGGCACTTGTTTCAGA) (SEQ ID NO:24) y 300 nM de cebador antisentido específico de gen (CAATAATGATGCGAGAACTGAAT) (SEQ ID NO:25) en agua hasta un volumen final de 50 uL. Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: 1) 48°C, 30 minutos; 2) 95°C, 10 minutos; y 3) 40 ciclos de 95°C, 15 segundos y 60°C, 1 minuto utilizando un sistema de detección de secuencias ABI 7700. Los niveles de transcripción se normalizaron a los genes constitutivos GAPDH o RPL19.

- 40 [0315] El análisis Taqman confirmó la sobreexpresión de ARNm de STOP-1 en estos tumores, especialmente páncreas, riñón, pulmón, ovario, tumores colorectales, tejido blando, estómago, tiroides y tumores urinarios. Catorce de dieciocho muestras de tumores de mama y colon mostraron una sobreexpresión de cinco a veintisiete veces en comparación con las muestras normales. Otros tipos de tumores también mostraron un incremento

aunque en un grado menor. Estos tipos de tumores incluían adrenal, hueso, cervical, endometrio, esófago, cabeza y cuello, riñón, hígado y euroendocrino.

Ejemplo 3 – Estudios de hibridación in situ

(a) Síntesis de sondas

- 5 [0316] Se secaron al vacío con velocidad 12,0 ul (125 mCi) de [alfa-³³P]UTP (NEN/Perkin-Elmer NEG307H) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ul siliconizada (Eppendorf). A cada tubo que tenía ³³P-UTP secado, se añadieron los siguientes reactivos y se incubaron durante 1 hora en una baño de agua a 37°C:

2,0 ul 5X tampón Transcription Optimized (Promega, P1181)

2,0 ul SQ H₂O

- 10 1,0 ul DTT, 100 mM (Promega, P1171)

2,0 ul mezcla rNTP, 2,5 mM [10 ul cada uno de 10mM rATP (Promega, P113B), rCTP (Promega, P114B) & GTP (Promega, P115B)+ 10 ul H₂O sin nucleasa (Promega, P1193)]

1,0 ul inhibidor de ARNasina Ribonucleasa (Promega, N2511)

- 15 1,0 ul plantilla de ADN (1 ug de plantilla de ADN amplificada con PCR lineal que codifica una parte de la STOP-1 humana que codifica la secuencia flanqueada por las secuencias promotoras de ARN polimerasa del bacteriófago T7 en la cadena superior para la transcripción de la sonda de control de sentido y del bacteriófago T3 en la cadena inferior para la transcripción de la sonda antisentido)

[0317] La secuencia en la reacción de transcripción con las sondas de sentido y antisentido fue:

**5'-GGGAGCCATG CGACCCCAGG GCCCCGCCGC CTCCCCGCAG CGGCTCCGCG
GCCTCCTGCT GCTCCTGCTG CTGCAGCTGC CCGCGCCGTC GAGCGCCTCT
GAGATCCCCA AGGGGAAGCA AAAGGCGCAG CTCCGGCAGA GGGAGGTGGT
GGACCTGTAT AATGGAATGT GCTTACAAGG GCCAGCAGGA GTGCCTGGTC
GAGACGGGAG CCCTGGGGCC AATGTTATTC CGGGTACACC TGGGATCCCCA
GGTCGGGATG GATTCA - 3' (SEQ ID NO:26)**

- 20 1,0 ul ARN Polimerasa T3 (Promega, P2083) para sondas antisentido o 1,0 ul de ARN Polimerasa T7 (Promega, P2075) para sondas de sentido.

- 25 [0318] A continuación, se añadió 1 ul de ARNasa-ADNasa libre RQ1 (Promega, M6101) al tubo Ependorf que contenía la sonda de ARN marcada radioactivamente y la reacción se incubó adicionalmente durante 15 minutos a 37°C. Esta etapa degradó la plantilla de ADN en la reacción. Para detener la reacción de degradación, se añadieron 90 ml de TE (Tris 10 mM pH 7,6/EDTA 1 mM pH 8,0) el tubo Eppendorf. Se extrajeron nucleótidos no incorporados utilizando un kit RNeasy Mini (Qiagen 74104, Germantown, MD).

- 30 [0319] El rendimiento de la sonda se determinó mediante el pipeteo sobre rondas separadas de papel de intercambio iónico DE81 (Whatman, 3658 325) de 1 ul de sonda prefiltrada y 1 ul de sonda después de la filtración. Las muestras se sumergen en 6 ml de Biofluor (Packard, 6NEF-961) en viales de centelleo (Wheaton Scientific, 986701) y se cuentan en Beckman LS 6500.

- 35 [0320] A continuación, la sonda se analizó en un gel de poliacrilamida al 6% TBE/Urea (Novex EC6865, Invitrogen, Carlsbad, CA) para confirmar que el transcrito era de la longitud correcta. Se añadieron 1x10⁶ cpm de sonda o 2 ul de marcador de ARN Novagen Perfect 0,1-1 kb (Novagen 69924-1) a 3 ul de tampón de muestra de TBE/Urea (Novex, LC6876). Los ARN se desnaturalizaron en bloques de calor de 95°C durante 3 minutos y, a continuación, se enfrió inmediatamente en hielo. Las muestras se desarrollaron a 180-250 voltios durante 45 minutos. El gel se expuso durante 1 hora a una película Biomax MS (Kodak, 829 4985) con una pantalla intensificadora en un congelador a -70°C.

(b) Hibridación In situ

- 40 [0321] El análisis de hibridación in situ se realizó inicialmente en secciones de tejidos normales y tumorales. Los portaobjetos se hibridaron a sondas de ARN de sentido y antisentido de STOP-1 humana utilizando las técnicas descritas a continuación. Se realizó un análisis adicional en secciones de microarrays de tejido (TMA) que

contenían numerosas muestras de tejido normal y tumoral. Las secciones de TMA se hibridaron exclusivamente con sondas de ARN antisentido.

[0322] Los portaobjetos se cocieron en un horno para adherir tejido al vidrio a 37°C durante la noche, seguido de 65°C durante 30 minutos. Las secciones se desparafinaron en una Leica Autostainer XL (Leica, Deerfield, IL) mediante la incubación de 3 veces durante 5 minutos cada vez con xilenos (Richard Allen, Kalamazoo, MI), a continuación la rehidratación a través de una serie graduada de etanol hasta agua destilada. A continuación, los portaobjetos se lavaron dos veces en 2X SSC (NaCl 0,3 M, citrato de Na 0,030 M, pH 7,0) durante cinco minutos cada vez. Los portaobjetos se trataron durante 15 minutos en una proteínasa K 20 mg/ml (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) en Tris 10 mM pH 8,0/ solución de NaCl 0,5 M a 37°C y se lavaron durante 10 minutos en 0,5X SSC (NaCl 0,075 M, citrato de Na 0,007 M, pH 7,0). Los portaobjetos se deshidrataron con un gradiente de etanol (70%- 95%- 100%) y se secaron al aire. Los portaobjetos se cubrieron con 100 ml de tampón de hibridación (formamida al 50%, sulfato de dextrano al 10% y 2X SSC) y se prehibridaron durante 1-4 horas a 42°C. La sonda de STOP-1 de una cadena marcada con [³³P] (orientación antisentido) referenciada anteriormente a una concentración de 2×10^6 cpm se disolvió en 100 ml de tampón de hibridación que contenía ARNt 1 mg/ml y se añadió al tampón de prehibridación en uno de los portaobjetos, se mezclaron bien, se cubrieron con un cubreobjetos y se dejaron hibridar durante la noche a 55°C en un recipiente humidificado sellado.

[0323] El procedimiento de hibridación anterior se realizó en otros portaobjetos del mismo bloque de tejido utilizando sonda de STOP-1 de cadena única marcado con [³³P] en la orientación de codificación.

[0324] Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron dos veces durante 10 minutos en 2X SSC que contenía EDTA 1 mM a temperatura ambiente, y a continuación, se incubaron durante 30 minutos a 37°C en ARNasa A 20 mg/ml en Tris 10 mM pH 8, NaCl 0,5 M. Los portaobjetos se lavaron durante 10 minutos en 2X SSC que contenía EDTA 1 mM a temperatura ambiente, a continuación se lavaron 4 veces durante 30 minutos cada vez en 0,1X SSC que contenía EDTA 1 mM a 55°C, y a continuación se lavaron en 0,5X SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se deshidrataron durante 2 minutos cada uno en etanol al 50%, 70% y 90% que contenía acetato de amonio 0,3 M y se dejaron secar al aire.

[0325] Se pusieron portaobjetos junto a una película de rayos X (Biomax MR Film, Kodak, 870 1302) durante 16 horas para obtener una valoración preliminar del éxito del experimento. A continuación, los portaobjetos se sumergieron en emulsión NTB2 (Kodak, 165 4433) [dilución 1:1 con H₂O], se dejaron secar durante la noche en oscuridad completa, se transfirieron en cajas ajustadas de luz con desecante y se dejaron exponer durante 4 semanas. Después de 4 semanas, se revelaron los portaobjetos utilizando el revelador D-19 [dilución 1:1 con H₂O] durante 3 minutos a 15°C, se lavaron y fijaron en fijador GBX durante 6 minutos a 15°C. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina y eosina antes del examen por un patólogo.

[0326] La tabla 7 muestra los resultados de los experimentos de hibridación in situ:

TABLA 7

TIPO DE TEJIDO	TEJIDO NORMAL (# de positivo/total)	TEJIDO TUMORAL (# de positivo/total)
Pulmón	2/16 adulto	41/49 adenocarcinomas 27/30 carcinoma de células escamosas 1/1 carcinoma de células grandes 2/5 tumor neuroendocrino de pulmón <u>Líneas celulares – todas dieron negativo</u> Calu-6 (carcinoma de pulmón anaplásico) Célula SK-MES (célula escamosa de pulmón) H322

		A549 (carcinoma de pulmón) H522
Mama	0/6 adulto	2/14 adulto
Colon	0/5 adulto	4/8 adulto
Intestino delgado	1/5 adulto	-
Páncreas	0/2 adulto	3/5 adulto
Corazón	0/2 adulto 0/4 adulto	- -
Placenta	0/5 adulto	-
Aorta	0/1 adulto	-
Vaso sanguíneo	0/1 adulto	-
Timo	0/1 adulto	-
Tráquea	0/1 adulto	-
Hígado	0/3 adulto	2/4 adulto carcinoma haptocelular
Tiroides	1/3 adulto	-
Piel	1/1 adulto en folículo y dermis	4/4 adulto melanoma
Estómago	0/3 adulto	-
Cerebro	0/4 adulto	-
Bazo	0/4 adulto	-
Nódulo linfático	0/3 adulto	0/4 linfoma adulto
Próstata	0/3 adulto	0/1 linfoma adulto
Ovario	1/1 adulto	2/2 adulto
Vejiga urinaria	0/1 adulto	3/3 carcinomas de células de transición
Vesícula biliar	0/1 adulto	-
Riñón	0/2 adulto	0/4 adulto
Adrenal	0/1 adulto	-
Endometrio	-	2/3 adulto
Cartílago	-	0/1 condrosarcoma
Adiposo	-	0/1 liposarcoma
Tejidos fetales	0/1 adulto	-

[0327] Los experimentos de hibridación in situ mostraron que la mayoría de muestras normales dieron negativo para ARNm de STOP-1. Por otro lado, un número sorprendentemente elevado de tumores de pulmón, tumores de colon, tumores pancreáticos, carcinomas hepatocelulares, melanomas, cánceres de ovario, cánceres endometriales, y carcinomas de células transicionales de vejiga urinaria mostraron una expresión significativa de ARNm de STOP-1. Además, el ARNm de STOP-1 se expresó principalmente en el estroma (por ejemplo, carcinomas de células escamosas de pulmón, adenocarcinomas, carcinoma de mama) y no los compartimentos epiteliales de la mayoría de tumores, con la excepción de los melanomas que expresaron el ARNm de STOP-1

en las células neoplásicas. Los pocos tejidos normales que dieron positivo para ARNm de STOP-1 mostraron expresión en tejido estromal, con la excepción del tejido tiroides, que expresó el ARNm de STOP-1 en sus células epiteliales. "-" indica que los tejidos no se examinaron.

Ejemplo 4 – Análisis Northern de ARNm de STOP-1 en tejidos normales

- 5 [0328] Se radiomarcaron sondas de ADNc de STOP-1 de humano y ratón (secuencias codificantes de longitud completa) con el kit de cebadores aleatorios (Perkin-Elmer) y se aplicaron para el análisis de transferencias de tejidos múltiples humanos y embriones de ratón (Clontech) según las instrucciones del fabricante. Los resultados se pueden observar en la figura 3a y b.
- 10 [0329] En tejidos humanos adultos normales, se detectó la mayor expresión de ARNm de STOP-1 en placenta, corazón y músculo esquelético (figura 3a). La figura 3b muestra una transferencia northern que indica la expresión intensa de ARNm de STOP-1 en embriones de ratón a los 7, 11, 15 y 17 días de desarrollo.

Ejemplo 5 – Construcciones de ADN de STOP-1

(a) Expresión en células de mamífero

- 15 [0330] Todas las secuencias de ADNc de STOP-1 de humano, ratón y pez cebra mutantes y de tipo natural se produjeron mediante PCR y se expresaron en vector pIRESpuo2 (BD Biosciences) o pIRESpuo2 con 8 X etiquetas HIS sintéticas que codifican la secuencia (HIP) para la expresión en células de mamífero. Los ADNc de FAP humano se expresaron en vector pFLAG-CMV N-terminal (Sigma).

TABLA 8

Construcción	Cebador sentido, 5'-3'	Cebador antisentido, 5'-3'	Sitios de clonación	Vector de clonación/comentarios
<u>HIP</u>	GATCGCGGCCG CACACCACCAT CACCATCACCA TCACTAAGTGA (SEQ ID NO:27)	GGCCTCACTTAG TGATGGTGATGG TGATGGTGGTGT GCGGCCCGC (SEQ ID NO:28)	BamHI/NotI	HIP pIRESpuo2; Vector original modificado con HIP con HIS C terminal, éstos son 2 oligos adpatadores
Construcción de pez zebra zf762HIP	CTGCGCTAGCA CCATGATGGGT ACTAAACTGAC TCAACTTT (SEQ ID NO:29)	GGAAGCGGCCCGC TTTTGGAAGCTCT TCAATGATCA (SEQ ID NO:30)	NheI/NotI	
m762pIRESpuo2	GAAGCTAGCAC CATGCACCCCC AAGGCCGCGCG GCCCCCCCCGCA GCTGCTGCTCG (SEQ ID NO:31)	GAAGCGGCCCGCT TATTTCGGTAGTT CTTCAATGATGA T (SEQ ID NO:32)	NheI/NotI	pIRESpuo2

h762pIRESpuro2	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	CAAGCGGCCGCT TATTTTGGTAGTT CTTCAATAATGA T (SEQ ID NO:34)	NheI/NotI	pIRESpuro2
h762HIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	NheI/NotI	HIP
ΔTHDh762HIP (1-54,94-243, más His)	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	TCAAAGCTTTCC CTCAGCATTCCA TTATACAGGTCC ACCACCT (SEQ ID NO:36)	NheI/HindIII	h762HIP
ΔΔTHDh762HIP (1-51,94-243, más His)	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	CTCAAAGCTTTC CCTCAGATACAG GTCCACCACCTC CCTCTG (SEQ ID NO:37)	NheI/HindIII	h762HIP
del-N-ter-HIP (1-32,54-243, más His)	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	GGGGAGCTCAGA GGCGCTCGACGG CGCGGGCA (SEQ ID NO:38)	NheI/SacI	HIP
	GAAGAGCTCAG GGAAAGCTTTG AGGAGTCCTGG A (SEQ ID NO:40)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	SacI/NotI	

h762G53AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (SEQ ID NO:39)	NheI/SalI	HIP
	GTGGTCGACCT GTATAATGCAA TGTGCTTACAA GGGCCAGCAGG A (SEQ ID NO:41)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	Sall/NotI	
h762N186AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	AATTGTCGACGC CATTTCAGGGCT TCCTTGGTCCAA (SEQ ID NO:42)	NheI/SalI	HIP
	TGGCGTCGACA ATTAATATTCA TCGCACTT (SEQ ID NO:43)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	Sall/NotI	
h762C55AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (SEQ ID NO:39)	NheI/SalI	HIP
	GTGGTCGACCT GTATAATGGAA TGGCCTTACAA GGGCCAGCAGG AGTGCCT (SEQ ID NO:44)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	Sall/NotI	

h762C93AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	CTCAAAGCTTTC CCTCAGAGCTTC CCCCTTTTCTCCT TTGAAT (SEQ ID NO:45	NheI/HindIII	h762HIP
h762C109AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	CCATGAGGCCTG CTTGTAGTTGGG TGTC (SEQ ID NO:46	NheI/StuI	HIP
	AGCAGGCCTCA TGGAGTTCATT GAATTAT (SEQ ID NO:47	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	StuI/NotI	
h762C126AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	TAAACGTTGCCT CCGCAATTTTCCC AAG (SEQ ID NO:48	NheI/AclI	HIP
	GGCAACGTTTA CAAAGATGCGT TCAAA (SEQ ID NO:49	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	AclI/NotI	
h762C149AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	GCATGCATTTCT GGCTTTTAGCCG AAGTGAGCCA (SEQ ID NO:50	NheI/NsiI	h762HIP
h762C153AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	CTGGCATGCTGC ATTTCTGCATTTT A (SEQ ID NO:51	NheI/SphI	HIP

	GCAGCATGCCA GCGTTGGTATT TCACATTCAA (SEQ ID NO:52)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	SphI/NotI	
h762C154AHIP	AATGCATGCGC TCAGCGTTGGT ATTCACA (SEQ ID NO:53)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	NsiI/NotI	h762HIP
h762C166AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	CCTGAGGCCTCA GCTCCATTGAAT GTGAAA (SEQ ID NO:54)	NheI/StuI	HIP
	CTGAGGCCTCA GGACCTCTTCC CATTGAA (SEQ ID NO:55)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	StuI/NotI	
h762C201AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	TCCGGCGCCAAT TCCTTCAGCAAG TCCTTCCACAGA AGAAGTGCGATG AA (SEQ ID NO:56)	NheI/KasI	HIP
	ATTGGCGCCGG ATTAGTGGATG TTGCTATCT (SEQ ID NO:57)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	KasI/NotI	
h762C218AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	TGAAGCGGTACC AACCAGATAGC AACATC (SEQ ID NO:58)	NheI/KpnI	HIP

	GGCGGTACCGC TTCAGATTACC CAAAAGGAGA (SEQ ID NO:59)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	KpnI/NotI	
h762N52AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (SEQ ID NO:39)	NheI/SalI	HIP
	GTGGTCGACCT GTATGCTGGAA TGTGCTTACAA GGGCCAGCA (SEQ ID NO:60)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	Sall/NotI	
h762G53AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (SEQ ID NO:39) Igual que para h762N52AHIP	NheI/SalI	HIP
	GTGGTCGACCT GTATAATGCAA TGTGCTTACAA GGGCCAGCAGG A (SEQ ID NO:41)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	Sall/NotI	
h762M54AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (SEQ ID NO:39) Igual que para h762N52AHIP	NheI/SalI	HIP

	GTGGTCGACCT GTATAATGGAG CGTGCTTACAA GGGCCAGCAGG AGT (SEQ ID NO:61)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	Sall/NotI	
h762P63A, P69AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	TCGGCCGGCCAC TCCTGCTGGCCCT TGTA (SEQ ID NO:62)	NheI/ NgoMIV	HIP
	GTGGCCGGCCG AGACGGGAGCG CTGGGGCCAAT GGCATTCCGGG TA (SEQ ID NO:63)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	NgoMIV/No tl	
P78A, P81AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	TGTGCCGGCAAT GCCATTGGCCCC AGG (SEQ ID NO:64)	NheI/ NgoMIV	HIP
	ATTGCCGGCAC AGCTGGGATCG CAGGTCGGGAT GGATTCAAAGG AGAAAA (SEQ ID NO:65)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	NgoMIV/No tl	

h762K87A, K90AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (SEQ ID NO:33)	TTCGCCGGCGAA TCCATCCCGACC TGGGAT (SEQ ID NO:66)	NheI/ NgoMIV	HIP
	TTCGCCGGCGA AGCGGGGGAAT GTCTGAGGGAA AGCTTT (SEQ ID NO:67)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (SEQ ID NO:35)	NgoMIV/NotI	
M762HIP	GAAGCTAGCAC CATGCACCCCC AAGGCCGCGCG GCCCCCCCCGCA	GAAGCGGCCGCT TTCGGTAGTTCTT CAATGAT (SEQ ID NO:68)	NheI/NotI	HIP
	GCTGCTGCTCG (SEQ ID NO:31)			
hFAPCMV	GAAGCGGCCGC AAGACTTGGGT AAAAATCGTAT TT (SEQ ID NO:69)	GAAAGATCTCTA GTCTGACAAAGA GAAACACTGCTT TAGGA (SEQ ID NO:70)	NotI/BglII	N-TERPFLAG cmv

(b) Expresión en baculovirus

- [0331] Para la expresión en baculovirus, se realizaron las siguientes construcciones de STOP-1 humana: STOP-1-pAcGP67B humana S31 que codifica S31-K243, STOP-1-pAcGP67B humana L94 que codifica L94-K243, y STOP-1-pAcGP67B humana E89 que codifica E89-K243 de STOP-1 humana. STOP-1-pAcGP67B humana S31 se generó en una estrategia de PCR de dos etapas. La parte 5' se generó a partir pAcGP67B utilizando los cebadores #161344 (GGATCGTCGGTTTTGTACAASSTOP-1GT) (SEQ ID NO:71) y #161347 (GGGGATCTCAGACGCAAAGGCAGAATGCGC) (SEQ ID NO:72). La parte 3' se generó a partir de DNA #84694 utilizando los cebadores #161348 (TCTGCCITTTGCGTCTGAGATCCCCAAGGGG) (SEQ ID NO:73) y #161732 (CCGTTCTGCAGTTAATGATGATGATGATGATGATGATGG) (SEQ ID NO:74). El inserto de longitud completa (que a continuación se subclona en pAcGP67B) se generó a partir de una reacción de PCR de partes iguales de partes 5' y 3' utilizando los cebadores #161344 y #161732.
- [0332] Se generó STOP-1-pAcGP67B humana L94 en una estrategia de PCR de dos etapas. La parte 5' se generó a partir de pAcGP67B utilizando los cebadores #161344 y #161349 (GCTTTCCCTCAGCGCAAAGGCAGAATGCGC) (SEQ ID NO:75). La parte 3' se generó a partir de DNA #84694 utilizando los cebadores #161350 (TCTGCCITTTGCGTCTGAGGGAAAGCITTGAGG) (SEQ ID NO:76) y #161346 (CCGGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGATGAT) (SEQ ID NO:77). El inserto de longitud completa (que a continuación se subclona en pAcGP67B) se generó a partir de una reacción de PCR de partes iguales de partes 5' y 3' utilizando los cebadores #161344 y #161346.
- [0333] Se amplificó el DNA #84694 mediante PCR para generar dos fragmentos que contienen S31-K243 y L94-K243 con etiquetas His C-terminal. Los fragmentos de PCR se subclonaron en el vector de transferencia de

baculovirus pAcGP67B (PharMingen), que a continuación se cotransfectaron con ADN de BaculoGold (PharMingen) en células Sf9. El virus recombinante se aisló y se amplificó en células Sf9.

[0334] Se generó STOP-1-pAcGP67B humana E89 en una estrategia de PCR de dos etapas. La parte 5' se generó a partir de pAcGP67B utilizando los cebadores #161344 (GGATCGTCGGTTTTGTACA STOP-1GT) (SEQ ID NO:71) y #161351 (ATTCCCCCTTTTCCGCAAAGGCAGAATGCGC) (SEQ ID NO:78). La parte 3' se generó a partir de DNA #84694 utilizando los cebadores #161352 (TCTGCCTTTGCGGAAAAGGGGAATGTCTGAG) (SEQ ID NO:79) y #161346 (CCGGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGAT) (SEQ ID NO:77). El inserto de longitud completa (que a continuación se subclona en pAcGP67B) se generó a partir de una reacción de PCR de partes iguales de partes 5' y 3' utilizando los cebadores #161344 y #161346.

Ejemplo 6 - Expresión de construcciones de ADN de STOP-1 y purificación de proteínas

[0335] Se transfectaron ADN que codificaba las construcciones de ADN de STOP-1 en células CHO-DP12, células CHO-psgb (células epiteliales CHO pgsB-618 deficientes en galactosiltransferasa I de hamster) (ATCC# CRL-2241) o células 293 (Roche) utilizando fosfato de calcio o reactivo de transfección de fugo 6 según las instrucciones del fabricante (Roche). Los medios de crecimiento se complementaron con 1 mM NiCl₂, 5 mM CaCl₂ y 50 mM Tris pH 7,6-8,0. Dieciséis horas después de la transfección, el suero que contenía el medio se sustituyó con medio sin suero y se dejó acumular la proteína durante 4-6 días. Las proteínas secretadas se purificaron utilizando esferas de agarosa Ni-NTA.

[0336] Se prepararon proteínas de lisados celulares mediante la lisis de las células cuatro días después de la transfección en tampón que contiene 50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 X cóctel de inhibidores de proteasa (ROCHE, [tampón de lisis]). Se realizó inmunoprecipitación mediante el preacclarado de lisados celulares (2 horas a 4°C) con 25 ml de proteína A inmovilizada/esferas de G-agarosa (Pierce) seguido de incubación (4 horas a 4°C) de alícuotas (0,5 ml) de lisados (4 x 10⁵ células por alícuota) con anticuerpo anti-epítipo de HIS (Qiagen) y con esferas de proteína A/G-agarosa. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón de lisis y una vez con solución salina tamponada con fosfato, se fraccionaron con SDS-PAGE al 10%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. (Invitrogen). Se realizó el análisis de transferencia Western con anti-HIS de ratón y el kit ECL (Amersham).

[0337] La figura 4A muestra que las células CHO-DP12, utilizadas normalmente para la expresión de proteínas recombinantes, produjeron poca STOP-1 secretada. En cambio, una célula mutante de CHO deficiente en la síntesis de proteoglicanos, CHO-Psgb, produjo mucho más STOP-1 secretado y produjo una mejor recuperación de las proteínas secretadas en forma soluble (figura 4B). Se transfectó pRK5 como control negativo. Las figuras 5a y b muestran que la proteína etiquetada con His se puede detectar con anticuerpos anti-His en sobrenadantes celulares y en lisados celulares, respectivamente, de células transfectadas CHO-psgb.

[0338] Para la producción de proteínas a partir de baculovirus, se infectaron células Hi5 con baculovirus amplificado. Después de 3 días en cultivo a 27°C, se recogió el medio mediante centrifugación. El sobrenadante se complementó con 50 mM Tris 8,0, 1 mM NiCl₂, 5 mM CaCl₂, y el pH se ajustó a 7,6. El medio se filtró y de cargó en una columna de agarosa Ni-NTA (Qiagen). La columna se lavó con 50 mM Tris 8,0, 300 mM NaCl, 2 mM benzamidina, 0,5 mM PMSF, y 5 mM imidazol. La elución se realizó en el mismo tampón con imidazol 300 mM. Las fracciones que contenían STOP-1 se agruparon y concentraron. La proteína se purificó sobre una columna Superdex-75 en 50 mM Tris 8,0, 100 mM NaCl, 0,5 mM PMSF, y 2 mM benzamidina. Las fracciones que contenían STOP-1 se agruparon, concentraron y utilizaron para pruebas de cristalografía y otros estudios.

Ejemplo 7 – Oligomerización de STOP-1

[0339] Se expresaron proteínas STOP-HIS de longitud completa o varios truncamientos de las mismas en células infectadas con baculovirus SF9 o células CHO descritas anteriormente. Las proteínas se purificaron a partir del medio utilizando esferas de agarosa Ni-NTA tal como se ha descrito anteriormente. Las proteínas expresadas en baculovirus S31-K243-His, E89-K243-His, o L94-K243-His se cargaron en una columna de exclusión de tamaño Shodex KW802.5 8mm x 300mm y se eluyeron con 100 mM NH₄HCO₃, 200 mM NH₄Cl pH 7,8 a una velocidad de flujo de 1 ml/ml. Las proteínas de longitud completa expresadas en CHO-psgb se cargaron en una columna de exclusión de tamaño Shodex KW804 8mm x 300mm y se eluyeron con fosfato de sodio 25 mM, NaCl 500 mM a una velocidad de flujo de 1ml/ml. Las proteínas expresadas en CHO-psgb, M1-M54 fusionada a L94-K243-His, se cargaron en una columna de exclusión de tamaño Shodex KW802.5 8mm x 300mm y se eluyeron con fosfato de sodio 25 mM, 500mM NaCl a una velocidad de flujo de 1 ml/ml.

[0340] Se analizó la proteína eluida mediante un sistema Agilent Modelo 1100 HPLC con un detector de múltiples longitudes de onda Agilent (UV) conectado a un instrumentos de dispersión de luz láser Wyatt MiniDAWN (LS) y un refractómetro diferencial Wyatt Optilab (RI). El peso molecular promedio de las proteínas o sus agregados en cada pico se determinó mediante la selección de un pico y utilizando el método de ajuste Zimm (Phillip J. Wyatt, (1993) Analytica Chimica Acta 272:1-40) con el paquete informático Astra (Wyatt, USA). El porcentaje de

agregación se calculó a partir de las áreas de pico integradas de la señal UV a 214 nm. Véanse las figuras 6 y 7 para los resultados.

[0341] El análisis de dispersión de luz indica que las proteínas S31-K243-His de baculovirus formaban principalmente moléculas triméricas (peso molecular aparente 74kD, 95% del área de pico integrada) (Figura 6A). Las proteínas E89-K243-His de baculovirus formaban complejos que eran aproximadamente 36% triméricos y 64% hexaméricos (es decir, peso molecular aparente de 126kD que representa el 36% del área del pico, PM aparente de 61kD que representa el 64% del área del pico) (Figura 6B). Sin embargo, se cree que los complejos hexaméricos formados por E89-K243-His son una anomalía debido a número impar de cisteínas. La proteína L94-243 de baculovirus, que carece de dominio de triple hélice, forma complejos triméricos (PM aparente de 59kD que representa el 98% del área del pico) (Figura 6C). Esto indica que el dominio N-terminal de la proteína y el dominio de triple hélice no son necesarios para la trimerización. La región L94-K243 es suficiente. El THD puede actuar para estabilizar los trímeros.

[0342] Las proteínas expresadas en CHO-psgb también formaban complejos (Figuras 7A-C). El análisis de dispersión de luz indicaba que la proteína expresada en longitud completa (M1-K243-His) formaba complejos que eran aproximadamente 58% hexaméricas y 42% triméricas (figura 7A). Los complejos formados por la expresión de delta-THD (M1-M54 y L94-L243-His) eran en parte triméricos (PM de 66kD que representaba el 61% del área del pico) y en parte heterogéneos en masa (PM promedio de 627kD) debido probablemente al estado de glicosilación variado de las proteínas en células CHO (figura 7B).

[0343] En geles SDS, la STOP-1 de longitud completa purificada expresada en células CHO-psgB migró como monómero bajo condiciones reductoras y como un dímero bajo condiciones no reductoras (sin DTT). Véase la figura 7C. Los resultados indican que la unión de disulfuro puede tener lugar entre dos monómeros.

Ejemplo 8 – Eliminación y análisis mutacional puntual de STOP-1

[0344] La STOP-1 (WT)-His de longitud completa, delta-THD-His, delta-delta-THD-His, delta-N-terminal y varios mutantes de mutaciones puntuales se expresaron en células CHO-psgb tal como se ha descrito anteriormente. Se prepararon extractos de extractos celulares completos. Se desarrollaron en un gel SDS bajo condiciones reductoras y no reductoras alícuotas de los extractos celulares completos o los medios en los que se cultivaron las células y se realizó una transferencia western con anticuerpo anti-His (kit de detección ECL, Amersham).

[0345] Las figuras 8A y B indican que se puede formar un enlace disulfuro entre dos monómeros en la región THD en extractos de sobrenadantes y lisados, respectivamente. Cada mutante por eliminación que carece del THD, que incluye cisteína 55, no pudo formar dímeros bajo condiciones no reductoras. Los homodímeros estaban presentes en el sobrenadante y lisados de células que expresan la proteína de longitud completa bajo condiciones no reductoras, pero no bajo condiciones reductoras. La tabla 9 resume los resultados de la siguiente manera:

TABLA 9

Construcción	Secreción	Dimerización
WT	+	+
delta-THD	+	-
delta-delta-THD	+	-
delta-N-ter	+	+
+" indica que el nivel de secreción o dimerización era el mismo que STOP-1 natural.		
"- " indica que la dimerización no era detectable en este ensayo.		

[0346] Los mutantes puntuales de STOP-1 humana se analizaron por la capacidad de secretar y dimerizar. Las figuras 9A y B muestran que la proteína STOP-1 de tipo natural y un mutante G53A se secretaron y que los homodímeros se observan en los sobrenadantes y lisados. Sin embargo, un mutante en 186 ("N" mutado a "A"), un potencial sitio de glicosilación, no estaba presente en el medio de cultivo y no se homodimerizaba. También se analizaron muchos otros mutantes. La tabla 10 resume los resultados de la siguiente manera:

TABLA 10

Construcción	Secreción	Dimerización
WT	+	+
N52A	+	+
G53A	++	+
M54A	+	+
P63A, P69A	+	+
P75A, P78A, P81A	+	+
K87A, K90A	+	+
N186A	-	-
"+" indica que el nivel de secreción o dimerización era el mismo o mejor ("++") que STOP-1 natural. "-" indica que la secreción o dimerización no era detectable en este ensayo. Todos estos mutantes a excepción de N186A se secretaron y se desarrollaron de forma similar a WT en geles de SDS.		

[0347] Las figuras 10A y B muestran el estado de una proteína STOP-1 humana que tiene mutaciones puntuales en los residuos de cisteína 55, 93 y 109. Las mutaciones puntuales también se realizaron en otras cisteínas de la proteína. La tabla 11 resume los resultados de la siguiente manera:

5

TABLA 11

Construcción	Secreción	Dimerización
WT	+	+
C55A	+	-
C93A	+	+
C109A	-	
C126A	-	
C153A	-	
C154A	-	
C153A, C154A	-/+	-/+
C166A	-	
C201A	-	
C218A	-	
"+" indica que el nivel de secreción o dimerización era el mismo que STOP-1 natural. "-" indica que la dimerización no era detectable de forma visible en este ensayo. "-/+" indica que la secreción o dimerización eran débilmente detectables en este ensayo.		

[0348] Todos los mutantes se expresaron, pero sólo dos fueron secretados, C55A y C93A. C93A se secretó y formó dímeros a diferencia de C55A, que se secretó pero no formó dímeros indicando que C55 es necesario para la unión de disulfuro en el interior de subunidades.

10

Ejemplo 9 – El mecanismo de Wnt sobrerregula el ARNm de STOP-1

[0349] El gen de STOP-1 se localiza en el cromosoma 8 humano entre 8q22 y 8q23. El gen se localiza próximo a los genes que codifican proteínas importantes en el mecanismo de señalización de Wnt, tal como el gen de FZD6 (homólogo 8 frizzled (drosophila)), el gen de WISP-1 (proteína 1 secretada inducible por WNT1). Existen por lo menos tres genes reguladores en el mecanismo Wnt que se mutan en cánceres humanos primarios y tumores experimentales de otras especies.

[0350] Los ratones transgénicos MTV-Wnt-1 fueron preparados por Genentech, Inc. Estos ratones sobreexpresan la proteína Wnt-1 bajo el control del promotor MMT. Las células C57Mg no sobreexpresan Wnt-1. Se extrajeron los tumores de mama en estos ratones. Se extrajo el ARNm de los tumores de mama o de células epiteliales de mama C57Mg. Se realizó una reacción de transcriptasa inversa con un cebador de oligo(dT), la transcriptasa inversa del virus de mieloblastosis aviar (Promega) y el ARNm extraído según las instrucciones del fabricante (Promega). La PCR en los productos transcritos de forma inversa se llevó a cabo con Ex-taq polimerasa (Takara) utilizando cebadores mRPL19 y cebadores de STOP-1 de ratón:

mRPL19:

5'-ATCGCCAATGCCAACTCCCGTCA-3' (SEQ ID NO:80) y

5'-GCTTGCGTGCTTCCTTGGTCTTA-3' (SEQ ID NO:81).

[0351] La mRPL19 es la proteína ribosómica mitocondrial murina L19 (MRPL19), una proteína constitutiva. Se utilizó la PCR utilizando cebadores contra mRPL19 como control para la extracción y la PCR de ARNm.

mSTOP-1:

5-TGCTGCTGCAGCTGCCCGCGCCGTCGAG-3 (SEQ ID NO:82) and

5-TCCAGTAGAAGCATCTCTTTTGGGTAA-3 (SEQ ID NO:83).

[0352] Los resultados muestran que el ARNm de mSTOP-1 se expresa en los tumores de mama de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1 (figura 11, carriles T1-T7), mientras que no se expresa en células epiteliales mamarias de ratón normal C57Mg ("N"). De este modo, se sugiere una conexión entre el mecanismo de señalización de Wnt y la expresión de STOP-1.

Ejemplo 10 - Coexpresión de STOP-1 con otros genes

[0353] Se analizó una base de datos privada que contenía la información de expresión de genes (GeneExpress®, GeneLogic Inc., Gaithersburg, MD) para genes que se expresan en los mismos tejidos que STOP-1 (análisis BLIST, software privado escrito y desarrollado en Genentech, Inc. para utilizar con la base de datos GeneExpress®). Mediante este método, se identificaron varios genes que tienen una correlación significativa de expresión en tumores de mama y colon. Los genes que se coexpresaron en tumores de mama y colon incluían Wisp-1 (un gen diana de WNT), SFRP2 (un receptor de WNT soluble), proteína de activación de fibroblastos (FAP), una serin proteasa de la superficie celular que se ha implicado en el cáncer por iones), cadena de alfa 2 de colágeno de tipo I, cadena de alfa 2 de colágeno de tipo V, Trombospondina 2 (THBS2) (ECM), ADAM12 (una enzima MMP), OB-Cadherina y OSF-2 (proteína TCI). Los últimos genes sugieren la implicación de STOP-1 en la formación y/o modulación de la matriz extracelular.

Ejemplo 11 - STOP-1 es separado por MMP-7 y MMP-9 in vitro

[0354] Materiales: La proteína STOP-1 etiquetada con His humana se produjo utilizando un sistema de expresión de baculovirus. Las metaloproteasas de matriz (MMPs)-1, -2, -3, -7, y -9 se adquirieron de Enzyme Systems Products. La tripsina se obtuvo de Sigma.

[0355] Digestión proteolítica de STOP-1: antes de la reacción con STOP-1, las MMP se activaron con acetato de p-aminomercúrico 1 mM durante 1 hora a 37 grados celsius. Se digirió STOP-1 (3 mg) con proteasas (50 ó 250 nM) en un volumen final de 20 ml durante 4 horas a 37 grados celsius. El tampón A (50 mM Tris, pH 8,75, 10 mM CaCl₂, 10 mM ZnCl₂ y 100 mM NaCl) fue el tampón utilizado para la reacción de separación de MMP. El tampón A que carecía de ZnCl₂ fue el tampón utilizado para las reacciones de separación con tripsina. Las reacciones de MMP se terminaron mediante la adición de EDTA (15 mM). La reacción con tripsina se terminó mediante la adición de PMSF (1 mM). A continuación, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie.

[0356] La figura 23 muestra la separación de proteína STOP-1 humana expresada en baculovirus por varias proteasas in vitro. La MMP-7 también separó la STOP-1 humana in vitro, mientras que las MMP-1, -2 y -3 produjeron productos de separación mínima o sin separación (datos no mostrados). MMP-7 produjo productos de separación de STOP-1 de aproximadamente 23 y 21 kDa. En cambio, MMP-9 produjo productos de separación de STOP-1 de aproximadamente 22 y 18 kDa. La tripsina produjo fragmentos de 20 y 22 kDa (datos no

mostrados). Estos datos sugieren que la actividad de STOP-1 puede estar regulada por proteólisis. Esto puede ser particularmente relevante con proteasas asociadas con estroma tumoral, tales como MMP-7 y MMP-9.

Ejemplo 12 – La expresión de STOP-1 promueve la proliferación de 3T3

(a) Cultivo celular y generación de líneas de células estables STOP-1 3T3

5 [0357] Las células 3T3 se mantuvieron en DMEM suplementado con FCS al 10%. Se establecieron líneas celulares que expresaban STOP-1 de ratón y humana mediante la transfección de células 3T3 con vectores m762pIRESpuo2 y h762pIRESpuo2 utilizando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche) según las instrucciones del fabricante. Los clones de STOP-1 se establecieron mediante la selección de células transfectadas con puromicina (4 g/ml).

10 (b) Ensayo de proliferación In vitro

[0358] Se transfectaron células 3T3 con STOP-1 de ratón, STOP-1 humana o vector solo tal como se ha descrito anteriormente y se emplacaron en placas de 96 pocillos a $1,5 \times 10^3$ células en DMEM con FCS al 10%. Doce horas más tarde, se cambió el medio a DMEM con FCS al 1,5% y 10 uCi/ml [^3H]-timidina. Después de 12 horas, 48 horas y 96 horas, las células se recogieron sobre un filtro GF/C utilizando un Filtermate 196 de 96 pocillos de Packard, se lavaron y contaron en un contador top, contador por centelleo de microplaca (Packard). Los resultados muestran que los clones que expresan STOP-1 demostraron una proliferación incrementada en comparación con clones transfectados con vector solo (puo2 y ph1). Véanse las figuras 12A y B.

(c) Expresión retroviral en líneas celulares 3T3

20 [0359] Se clonó el ADNc de STOP-1 de longitud completa humana a partir de H762pirespuo2 en el vector pMSCV1(puro) (Clontech) y se introdujo en fibroblastos 3T3 y células 293 mediante infección retroviral utilizando el método descrito por Maecker et al., (Maecker H.L., et al., Cancer Cell 2, 139-148, 2002). Resumidamente, se emplacaron 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se cambiaron a medio con poco suero (suero de ternera fetal al 0,25%) al día siguiente. Las células infectadas de manera retroviral se seleccionaron en puromicina (3 $\mu\text{g/ml}$). Después de 24 horas, se midió la proliferación celulares utilizando el kit de Cell Titer (Promega). La figura 13C muestra que la infección con retrovirus STOP-1 induce la proliferación de células 3T3 y 293, respectivamente, en comparación con células 3T3 o 293 infectadas con un control.

30 [0360] Para la detección de proteína STOP-1, se prepararon lisados de células completas de residuos celulares ($\approx 2 \times 10^6$ células) y se incubaron con anticuerpo S7-IgG (1 mg) descrito a continuación y posteriormente se inmunoprecipitaron con proteína A/G. A continuación, los inmunoprecipitados se desnaturalizaron y transfirieron a membranas de nitrocelulosa. A continuación, se detectó STOP-1 utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-STOP-1. Las figuras 13A y B muestran la expresión de STOP-1 en células 3T3 y 293 e lisados de células completas después de la infección con retrovirus STOP-1 en comparación con un vector de control, Babe.

Ejemplo 13 – La expresión de STOP-1 provoca la tumorigénesis en ratones

35 [0361] Se inocularon subcutáneamente ratones nu/nu atímicos hembra (Charles River Laboratory, [5 animales por grupo]) con 1×10^6 células 3T3 transfectadas de forma estable con STOP-1 de ratón o humano, ADNc de RAS (Hudziak RM, Lewis GD, Shalaby MR, Eessalu TE, Aggarwal BB, Ullrich A, Shepard HM. (1988) Proc Natl Acad Sci. 85(14), pp.:5102-6) o un vector puro2 vacío (p2). El crecimiento tumoral se midió 1 vez por semana. Las líneas de células 3T3 estables también se evaluaron por la expresión de STOP-1 mediante la preparación de lisados de células completas de células residuales, la realización de SDS-PAGE en alícuotas de los lisados o medios de cultivo celular, y transferencia western de los geles y su sondeo con anticuerpo anti-STOP-1 de conejo. Las células transfectadas con ADNc de RAS sirvieron como controles positivos. Véanse las figuras 14A-C.

45 [0362] Los resultados muestran que STOP-1 murina estaba presente en los lisados de todos los clones de NIH 3T3, pero sólo estaba presente en los medios de cultivo celular de dos de los tres clones de NIH 3T3 (figuras 14B y C, respectivamente). En otras palabras, el clon 18 expresó la proteína intracelularmente, pero era defectuoso en la secreción de la proteína STOP-1 murina. Véase la figura 14B. Además, los dos clones que secretaron STOP-1 produjeron tumores en ratones desnudos, mientras que el clon que era deficiente en la secreción no lo hizo (figura 14A). Estos resultados sugieren que la STOP-1 murina secretada por sí misma puede ser tumorigénica, mientras que la STOP-1 expresada intracelularmente no lo es.

50 [0363] Los resultados también muestran que la STOP-1 humana puede impulsar la tumorigénesis en ratones. Véase la figura 15. Los tumores crecieron en varios ratones que expresaban la proteína STOP-1 humana y en el control de RAS, pero no en los ratones tratados con células transfectadas con el vector solo. Como la STOP-1 de ratón, estos resultados sugieren que la STOP-1 humana secretada por sí misma puede ser tumorigénica.

Ejemplo 14 - STOP-1 induce la curación de heridas

[0364] Las células SK-MEL-31 de melanoma maligno se mantuvieron en DMEM suplementado con FCS al 10%. Las células SKMEL-31 se cultivaron en placas de 6 pocillos (Corning) hasta que alcanzaron la subconfluencia, a continuación se dejaron sin nutrientes durante 8 horas en DMEM con FCS inactivado con calor al 2%. A continuación, las células se trataron durante 2 horas en DMEM sin FCS con 10 mg/ml mitomicina C (Sigma) y se sometieron al siguiente ensayo de cierre de heridas in vitro.

[0365] Se introdujo un área libre de células mediante el raspado de la monocapa de células SK-MEL-31 con una punta de pipeta amarilla. Se evaluó la migración celular al área libre de células durante 48 horas después del raspado mientras las células se mantenían en DMEM complementado con FCS al 2% desactivado con calor en ausencia o presencia de 30 ng/ml de EGF (Roche), 1 g/ml de proteína STOP-1 de longitud completa humana expresada en baculovirus, ambos o ninguno. Las figuras 16A-E son fotografías en contraste de fase del área raspada 48 horas después del raspado.

[0366] Los resultados muestran que las células migradas al área raspada cuando se trataron con EGF o STOP-1, especialmente STOP-1 expresada de células CHO-psgB. Los resultados indican que la STOP-1 induce la migración celular. La migración celular tiene lugar en el crecimiento de tumores ya que invade el tejido circundante. Los datos dan soporte además las propiedades de STOP-1 inductoras de tumores.

Ejemplo 15 – Desarrollo de anticuerpos monoclonales

[0367] Se hiperinmunizaron diez ratones BALB/c (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) con STOP-1 humana etiquetada con polihistidina recombinante (HIS8) (también conocida como. DNA 145960) expresada de forma transitoria en células de ovario de hámster chino PSGB (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) en adyuvante Ribi (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO). Se fusionaron células B de cinco ratones que demostraron títulos de anticuerpo anti-STOP-1 con células de mieloma de ratón (X63.Ag8.653; American Type Culture Collection, Rockville, MD) utilizando un protocolo modificado análogo a uno descrito anteriormente (Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Nature 256: 495-497; Hongo, J.S., et al., (1995) Hybridoma 14:253-260).

[0368] Después de 10-14 días, se recogieron los sobrenadantes y se cribaron para la producción de anticuerpos mediante ensayo inmunoabsorbente directo unido a enzimas (ELISA). Se inyectó un clon positivo (6B12.1.7) que mostraba la mayor inmunounión después de la segunda ronda de subclonación mediante dilución limitante, en ratones cebados con Pristane (Freund YR y Blair PB (1982) J Immunol 129:2826-2830) para la producción in vivo de MAbs. EL fluido ascítico se agrupó y purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína A (Pharmacia fast protein liquid chromatography [FPLC]; Pharmacia, Uppsala, Sweden) tal como se ha descrito previamente (Hongo et al., 1995, supra). El preparado de anticuerpo purificado se filtró de forma estéril (tamaño de poro de 0,2 µm; Nalgene, Rochester NY) y se almacenó a 4°C en solución salina de tampón fosfato (PBS). El clon del hibridoma que produce el anticuerpo 6B12 se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA el 28 de marzo del 2003 como "6B12.1.7".

[0369] El sitio de unión para el anticuerpo 6B12 se mapeó en una región N-terminal de STOP-1 humana. Las construcciones etiquetadas de His que codifican la proteína de longitud completa humana, la proteína delta-THD, la proteína delta-delta-THD, la proteína delta-N-terminal y la proteína de longitud completa de pez cebra se expresaron en células CHO-psgB. Las alícuotas de extractos celulares transfectados se desarrollaron en SDS-PAGE, se realizó una transferencia western y se sondaron con anticuerpo anti-His o anticuerpo 6B12.

[0370] El anticuerpo monoclonal 6B12 funcionó bien en los westerns. Véanse las figuras 17C. Se unió a todas las proteínas humanas expresadas tal como se describe anteriormente, a excepción de la proteína delta-N-terminal. Por lo tanto, el epítipo de unión del anticuerpo 6B12 se mapea en los aminoácidos N-terminales #33-52 de STOP-1 humana. El anticuerpo 6B12 no reconoció la proteína STOP-1 de pez cebra en una transferencia western.

Ejemplo 16 – anticuerpos derivados de fagos contra STOP-1

[0371] Resumen: Los anticuerpos derivados de fagos contra STOP-1 se produjeron utilizando, en parte, materiales y métodos descritos en la solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/385.338 ("la solicitud '338"), solicitada el 3 de junio del 2002. En este estudio, los fagémidos se modificaron posteriormente y los anticuerpos resultantes se cribaron en base a la unión a STOP-1 oligomerizada.

[0372] Construcción de fagémido Fab y F(ab)₂: El vector fagémido, pS0643 (también conocida como pHGHmg3, por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.688.666, Ejemplo 8), contiene los orígenes de replicación pBR322 y f1, un gen resistente a ampicilina, un promotor de fosfatasa alcalina (phoA) de E. coli (Bass et al., (1990) Proteins 8:309-314), y una secuencia que codifica una secuencia señal de secreción stII fusionada a los residuos 1-191 de la hormona de crecimiento humano (hGH) y una secuencia que codifica los residuos C-terminales 267-421 de la proteína III de fago M13 (de aquí en adelante, cP3). El fagémido pS0643 también contiene un sitio XbaI y un codón de parada ámbar después del residuo 191 de hGH. La secuencia señal de

secreción stII puede exportar una proteína al periplasma de una célula bacteriana (por ejemplo, una región de cadena ligera (LC) de un anticuerpo). En este estudio, la secuencia que codifica la hormona de crecimiento humano (hGH) se extrajo del vector pS0643 y se sustituyó por un fragmento de ácido nucleico NsiI/XbaI que codificaba un fragmento Fab anti-Her2 humanizado (secuencia "h4D5") ligado en el marco con la señal de secreción stII (humAb4D5-8, véase Carter et al., (1992) PNAS 89:4285-4289, Tabla 1 y la figura 1 en la misma o la patente de Estados Unidos No. 5,821,337, para la secuencia).

[0373] El anticuerpo h4D5 es un anticuerpo humanizado que reconoce específicamente un antígeno asociado con cáncer conocido como Her-2 (erB2). En este estudio, el h4D5 se obtuvo mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando la secuencia de la versión 8 de humAb4D5 ("humAb4D5-8") y cebadores diseñados para ocasionar un sitio 5' NsiI y un sitio 3' XbaI en el producto PCR (Carter et al., (1992) PNAS 89:4285-4289). El producto PCR se separó con NsiI y XbaI y se ligó en el vector fagémido pS0643. La secuencia de ácidos nucleicos de h4D5 codifica las regiones de CDR modificadas de un anticuerpo monoclonal de ratón específica para Her-2 en un armazón Fab de secuencia consenso mayoritariamente humana. Específicamente, la secuencia contiene una cadena ligera kappa (región LC) en dirección 5' de los dominios VH y CHI (región HC). El método de fabricación del anticuerpo anti-Her-2 y se proporciona la identidad de las secuencias de dominio variable en la patente de Estados Unidos Nos. 5,821,337 y 6,054,297.

[0374] El plásmido pS0643 que contenía 4D5 humanizada (versión 8) aún se modificó adicionalmente. Por ejemplo, se añadió un epítipo etiqueta de glicoproteína D de virus de herpes simplex de tipo 1 (etiqueta gD) en el marco al extremo C-terminal de la LC utilizando mutagénesis dirigida de sitio. Después del codón de parada en dirección 3' de la LC, se unieron un sitio de unión a ribosoma y una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia señal stII al extremo N-terminal de la secuencia de HC. Consecuentemente, la secuencia de HC está en el marco con el dominio C-terminal de la p3 (cP3), una proteína de cubierta menor del fago M13. De este modo, se puede producir un Fab expresado en el fago a partir de una construcción. Este vector fagémido Fab se refiere como pV0350-2b (Figuras 25A-H) y se puede ilustrar esquemáticamente como la figura 24A.

[0375] Para generar F(ab)₂ expresado en fagos, el vector pV0350-2b se modificó adicionalmente mediante la inserción de una secuencia GCN4 de cremallera de leucinas dimerizable (GRMKQLEDKVEELLSXNYHLENEVARLKKLVGERG) (SEQ ID NO:84) entre las secuencias HC y cP3 mediante mutagénesis de cassette. La cremallera de leucinas GCN4 une dos grupos de polipéptidos de fusión LC/HC-cP3 fusion en el periplasma de E. coli y presenta el dímero en la superficie de fago. Este vector fagémido F(ab)₂ se refiere como pV0350-4 (figuras 26A-H) y se puede ilustrar esquemáticamente como la figura 24B.

Generación de bibliotecas F(ab) con la diversidad H1/H2/H3 para utilizar en la selección de STOP-1:

[0376] Se creó una biblioteca diversificada para hallar anticuerpos anti-STOP-1 mediante la mutación de las secuencias que codifican las regiones variables de HC en el vector pV0350-2b y pV0350-4 utilizando mutagénesis Kunkel y el cribado del fago que los contiene en base a la unión a STOP-1 humana mediante ensayo ELISA. El método de cribado se describe con mayor detalle a continuación. Se pueden obtener otros anticuerpos que tienen una especificidad mayor o afinidad a STOP-1 mediante, por ejemplo, la mutagénesis adicional de las secuencias Fab y F(ab)₂ (por ejemplo, mediante mutagénesis Kunkel, (Kunkel et al., (1987) Methods Enzymol. 154:367-382)) en sus regiones CDR de LC y su cribado mediante la unión a STOP-1.

[0377] Expresión en fago: Se transformó la cepa SS320 de E. coli con el ADN mutageneizado descrito anteriormente mediante electroporación. El tamaño de las bibliotecas fue de aproximadamente 10⁹. Las células bacterianas transformadas se desarrollaron durante la noche en presencia del fago auxiliar KO7 para producir la expresión de fago que podría aún infectar otras células bacterianas. A continuación, la cepa de E. coli XL-1 Blue (Stratagene, San Diego, CA) se infectó con fago F(ab) o F(ab)₂ y a continuación se desarrollaron fagos auxiliares KO7 (Stratagene, San Diego, CA) en medio 2YT a 37°C durante 20 horas y se recogieron los fagos tal como se ha descrito (Sidhu et al., Methods Enzymol. (2000), 328:333-363). En resumen, se purificó el fago mediante la su precipitación en primer lugar del medio de cultivo de la noche con polietilenglicol y se resuspendió en PBS. Los fagos se cuantificaron mediante espectrofotómetro con su lectura a 268nm (1 OD=1,13 x 10¹³/ml).

[0378] Separación de fagos: Las bibliotecas de fagos se sometieron a cuatro rondas de separación. Se recubrieron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con 100 ul/pocillo de antígeno diana (STOP-1 de longitud compelta humana etiquetada con hi expresada en CHO-psgb o aminoácidos #94-243 ("forma corta") etiquetada con hi humana expresada en baculovirus) (5 ug/ml) en PBS a 4°C durante la noche o temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se bloquearon con 65 ul de proteína bloqueante al 1% durante 30 min y 40 ul de Tween20 al 1% durante otros 30 min (proteína bloqueante: 1ª ronda – albúmina de suero bovino (BSA), 2ª ronda -ovoalbúmina, 3ª ronda-caseína, 4ª ronda -ovoalbúmina). A continuación, se diluyó el fago de la biblioteca hasta 3-5 D.O/ml con BSA al 1% con Tween 20 al 0,1% (1 D.O = 1,13 x 10¹³ fagos/ml). En general, la entrada de fagos fue en la primera ronda de 3-5 D.O/ml, 2ª ronda 3 D.O/ml, 3ª ronda 0,5±1 D.O/ml y la entrada de la 4ª ronda 0,1±0,5 D.O/ml. El fago diluido se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron por lo menos cinco veces de forma continua con PBS y Tween20 al 0,055. El fago de biblioteca bloqueado se añadió en 100 ul/pocillo a 8 pocillos recubiertos de antígeno diana y 2 pocillos no recubiertos a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron de forma continua por lo menos 10 veces con PBS y Tween20 al 0,05%.

Los fagos se eluyeron con 100 ul/pocillo de HCl 100 mM a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los fagos eluidos (de pocillos cubiertos) y el fago de base (de pocillos no cubiertos) se recogieron en tubos separados. Las recogidas eluidas se neutralizaron mediante la adición de un volumen 1/10 de Tris 1 M pH 11,0 a ambos tubos. Se añadió BSA hasta un 0,1% final en el tubo de fago eluido. El fago eluido se calentó a 62°C durante 20 minutos. Para titular el fago, se infectaron 90 ul de XL-1 de fase logarítmica (DO 600 nm ≈ 0,1-0,3) con 10 ul de fago eluido o fago de base a 37°C durante 30 minutos. A continuación, las células infectadas se diluyeron en serie en incrementos de 10 veces con 90 ul de 2YT. Se emplacaron alícuotas de 10 ul de células infectadas por placa de carbenicilina.

[0379] Para propagar el fago, se utilizaron aproximadamente 400 ul de fago eluido para infectar ≈ 4 ml de XL-1 soup en fase logarítmica (DO 600nm ≈ 0,1-0,3) a 37°C durante 30-45 minutos. Se añadieron fago auxiliar, KO7, y carbenicilina a la infección a una concentración final de 1×10^{10} pfu/ml KO7 y 50 ug/ml de carbenicilina a 37°C durante otra hora. El cultivo se desarrolló en medio 50:50 2YT/CRAP con carbenicilina 50 ug/ml y 50ug/ml de kanamicina hasta volúmenes finales de 20~25ml a 37°C durante la noche (o por lo menos 17 horas). El próximo día, el cultivo se desarrolló a 30C durante otras 2 horas para incrementar el rendimiento de fago.

[0380] El fago se purificó mediante centrifugación de las células a 8000 rpm durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante. Se añadió PEG al 20%/NaCl 2,5 M a 1/5 del volumen de sobrenadante, se mezcló y se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. El fago se centrifugó en un residuo a 12000 rpm durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 5000 rpm. Los residuos se resuspendieron en 1 ml de PBS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 15 minutos para depurar la debris. Las etapas que empezaban con la adición de PEG/NaCl se repitieron en el residuo resuspendido. La DO del residuo de fagos resuspendidos se leyó a 270 nm.

[0381] La segunda, tercera y cuarta rondas de la separación de fagos se completaron mediante la repetición de las etapas de separación de fagos descritas anteriormente. Los anticuerpos de fagos que se seleccionaron en base a la unión a la forma corta se designaron como "S#" (por ejemplo, S4, S9, S7 y S16). Los anticuerpos de fagos que se seleccionaron en base a la unión a la forma de longitud completa se designaron como "F#" (por ejemplo, F5, F6, F13 y F47).

[0382] Ensayo de cribado ELISA: se cribaron clones de las clasificaciones 2 a 4 por la especificidad y afinidad mediante ensayo ELISA. Los clones positivos (enlazadores) fueron clones que presentaban una unión por encima de la base a los antígenos diana y no a otra proteína no relevante, tal como albúmina de suero bovino y factor-1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1).

[0383] En primer lugar, los pocillos de una placa de microtitulación de 384 pocillos se recubrieron con STOP-1 humana etiquetada con his de longitud completa o "forma corta" (#93aa-243aa), IGF-1, Her-2 o anti-gD a 20 ul por pocillo (2 mg/ml en PBS) a 4°C durante la noche a temperatura ambiente durante 2 horas.

HER2	STOP-1
Anti-gD	IGF-1

En otra placa de 96 pocillos, se desarrollaron colonias de las separaciones 2-4 durante la noche a 37°C en 150 ul de medio 50:50 2YT/CRAP con carbenicilina 50 mg/ml y fago auxiliar KO7. La placa se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos. Se mezclaron 50 ul del sobrenadante con 120 ul de tampón ELISA (PBS) – BSA al 0,5% y Tween20 al 0,05%). Se añadieron 30 ul de la mezcla a cada cuadrante de la placa de recubrimiento de 384 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La unión se cuantificó mediante la adición de 75 ul/pocillo de anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en PBS más BSA al 0,5% y Tween 20 al 0,05% a temperatura ambiente durante 30 minutos (Sidhu et al., supra). Los pocillos se lavaron con PBS – Tween 20 al 0,05% por lo menos cinco veces. A continuación, se añadieron al pocillo 100 ul/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y solución B de peroxidasa (H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 ul de ácido fosfórico 1 M (H₃PO₄) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) a cada pocillo. La DO del color amarillo en cada pocillo se determinó utilizando un lector de placas ELISA estándar a 450 nm. La concentración de fagos F(ab)₂ que dio lugar a aproximadamente el 90% de unión máxima a la placa recubierta se utilizó en los ELISA de competición de unión en solución. Los fagos F(ab) y F(ab)₂ que tenían una unión 3-4 veces superior que BSA, IGF-1, Her2 y anti-gD se consideraron que tenían una especificidad mejor. Se secuenciaron estos enlazadores.

[0384] La figura 18 muestra una secuencia de aminoácidos parcial de varios de los enlazadores que presentaban una afinidad y especificidad mayor (por ejemplo, S7, S16, F5, S4, F13, F47 y S9). Tres clones comparten secuencias de CDR idénticas - F13, F47 y S4. S7 y S16 también comparten cierta homología de secuencia. En

base a la homología de secuencia entre F13, F47, S4, S7, S9 y S16, en sus regiones V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3, se derivaron secuencias consenso para el epítipo reconocido en común. En las figuras 27A-C, 28A-C, 29A-C, 30A-C y 31A-C, respectivamente, se pueden encontrar las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican un fago que expresa S4-Fab, un fago que expresa S9-Fab, un fago que expresa S7-F(ab)₂, un fago que expresa S16-F(ab)₂, un fago que expresa P5-F(ab)₂. S7 tiene las SEQ ID NOs: 8-10; S56 tiene las SEQ ID NOs: 11-13; F5 tiene las SEQ ID NOs: 14-16; S4, F13 y F47 tiene las SEQ ID NOs: 17-19; y S9 tiene las SEQ ID NOs: 20-22.

[0385] Los siguientes vectores se han depositado bajo los términos del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA tal como se describe a continuación:

Material	Depósito No.	Fecha de depósito
V0350-4-S7	PTA-5090	25 de marzo del 2003
V0350-4-S16	PTA-5089	25 de marzo del 2003
V0350-2b-S4	PTA-5086	25 de marzo del 2003
V0350-2b-S9	PTA-5087	25 de marzo del 2003
V0350-4-F5	PTA-5088	25 de marzo del 2003

Ejemplo 17 - - ELISA de competición de unión a solución

[0386] Para determinar una afinidad de unión para fagos F(ab) y F(ab)₂ seleccionados, se realizaron ELISAs de competición.

[0387] En primer lugar, los fagos se propagaron y purificaron. Se emplacaron diez microlitros de bacterias XL-1 infectadas con uno de los clones durante 30 minutos a 37°C en una placa de carbenicilina. Se recogió una colonia y se desarrolló en 2 ml (2YT y 50 ug/ml de carbenicilina) a 37°C durante 3-4 horas. Se añadió fago auxiliar, KO7 al cultivo a una concentración final de 10¹⁰ pfu/ml durante otra hora a 37°C. Se añadieron veinte ml de medio (2YT/CRAP 50:50 con 50 ug/ml de carbenicilina) al cultivo para el crecimiento durante la noche a 37°C. Los fagos se purificaron tal como se ha descrito anteriormente

[0388] En segundo lugar, se determinó la concentración de fagos purificados que sería la óptima para utilizar en el siguiente ensayo ELISA de competición (es decir, aproximadamente el 90% de la capacidad de unión máxima en la placa recubierta). Se recubrieron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con STOP-1 humana de longitud completa o forma corta (2 ug/ml en PBS) a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se bloquearon mediante la adición de 65 ul de BSA al 1% durante 30 minutos seguido de 40 ul de Tween 20 al 1% durante otros 30 minutos. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS – Tween20 al 0,05% 5 veces. Se añadieron varias diluciones de fagos F(ab) o F(ab)₂ hasta 0,1 D.O./ml en tampón ELISA (PBS – BSA al 0,1% y Tween20 al 0,05%) a los pocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS – Tween 20 al 0,05% por lo menos tres veces. Se añadieron 75 ul de anticuerpo anti-M13 conjugado a HRP (Amersham, dilución 1/5000 con tampón ELISA) por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS – Tween20 al 0,05% por lo menos cinco veces. A continuación, se añadieron al pocillo 100 ul/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y solución B de peroxidasa (H₂O₂) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 ul de ácido fosfórico 1 M (H₃PO₄) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) a cada pocillo. La densidad óptica del color en cada pocillo se determinó utilizando un lector de placas ELISA estándar a 450 nm. Las diluciones de fagos se representaron frente a las lecturas de D.O.

[0389] En tercer lugar, se realizó un ELISA de competición. Se recubrieron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con STOP-1 humana de longitud completa o forma corta (2 ug/ml en PBS) a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se bloquearon mediante la adición de 65 ul de BSA al 1% durante 30 minutos seguido de 40 ul de Tween 20 al 1% durante otros 30 minutos. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS – Tween20 al 0,05% 5 veces. En base al ensayo de unión anterior, se incubaron 50 ul de la dilución de fago que daba lugar a aproximadamente el 90% de unión máxima a la placa recubierta con 50 ul de varias concentraciones de STOP-1 humana de longitud completa o forma corta (0,1 a 500 nM) en solución de tampón ELISA durante 1 hora a temperatura ambiente en un pocillo. El fago no unido se analizó mediante la transferencia de 75 ul de la mezcla de pocillos a una segunda placa de 96 pocillos precubierta con STOP-1 humana de longitud completa o forma corta y la incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los

pocillos de la segunda placa se lavaron con PBS-Tween 20 al 0,05% por lo menos tres veces. Se añadieron 75 ul de anticuerpo anti-M13 conjugado a HRP (Amersham, dilución 1/5000 con tampón ELISA) por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS – Tween20 al 0,05% por lo menos cinco veces. A continuación, se añadieron al pocillo 100 ul/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y solución B de peroxidasa (H₂O₂) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 ul de ácido fosfórico 1 M (H₃PO₄) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) a cada pocillo. La densidad óptica del color en cada pocillo se determinó utilizando un lector de placas ELISA estándar a 450 nm. Las concentraciones de STOP-1 competidos se representaron frente a las lecturas de D.O. La IC₅₀, la concentración de STOP-1 que inhibe el 50% del fago F(ab) o el fago (Fab)₂, representa la afinidad. Véase la tabla 12.

[0390] La tabla 12 muestra que F5 se une al extremo N-terminal de STOP-1 de longitud completa, pero no a la forma corta. S7, S16, S9 y S4 (y por tanto F13 y F47) se unen a la forma corta (#94-243) de STOP-1 humana. En la tabla 2, el término "762 S/S" indica que los pocillos de la placa de microtitulación estaban recubiertos con la forma corta de STOP-1 humana y que el fago F(ab) o el fago (Fab)₂ competían con la forma corta de STOP-1 humana. El término "762 S/F" indica que los pocillos de la placa de microtitulación estaban recubiertos con la forma corta de STOP-1 humana y que el fago F(ab) o el fago (Fab)₂ competían con la forma de longitud completa de STOP-1 humana. El término "762 F/F" indica que los pocillos de la placa de microtitulación estaban recubiertos con la forma de longitud completa de STOP-1 humana y que el fago F(ab) o el fago (Fab)₂ competían con la forma de longitud completa de STOP-1 humana. "ND" indica que el resultado no era detectable. "N/A" indica que el resultado no estaba disponible.

TABLA 12

F(ab)₂	762 S/S	762 S/F	762 F/F	Unión a STOP-1
S7	35 nM	4,7 nM	2,7 nM	Forma corta
S16	114 nM	No disponible	32 nM	Forma corta
F5	No detectable	1 uM	No disponible	Longitud completa
Fab	762 S/S	762 S/F	762 F/F	Unión a STOP-1
S4	3 nM	719 nM	0.9 nM	Forma corta
S9	>1 uM	331 nM	No disponible	Forma corta
F13	3,8 nM	795 nM	No disponible	Forma corta
F47	3,8 nM	795 nM	No disponible	Forma corta

[0391] Estos anticuerpos también reconocieron la STOP-1 humana en inmunoprecipitaciones.

Ejemplo 18 – Ensayo de bloqueo de 6B12

[0392] También se exploró la localización de unión de ciertos fagos F(ab)₂. Se sabe que el anticuerpo monoclonal anti-STOP-1 humana, 6B12, se une a una región N-terminal de la proteína STOP-1 humana. Por lo tanto, se analizó si el 6B12 podía bloquear la unión de ciertos fagos F(ab)₂ a STOP-1.

[0393] El ensayo de bloqueo de 6B12 se realizó de la siguiente manera: se recubrieron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con STOP-1 humana de longitud completa (2 ug/ml en PBS) a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se bloquearon mediante la adición de 65 ul de BSA al 1% a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de 40 ul de Tween20 al 1% durante otros 30 minutos. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS – Tween20 al 0,05% 5 veces. Se incubaron varias concentraciones de anticuerpo 6B12 (en tampón ELISA) en los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron los fagos S7-F(ab)₂, S16-F(Ab)₂ o F5-F(ab)₂ a cada pocillo durante 10 minutos a una concentración que normalmente produciría el 90% de la capacidad de unión en ausencia del anticuerpo 6B12. Los pocillos se lavaron con PBS – Tween20 al 0,05% 5 veces

[0394] La unión se cuantificó mediante la adición de 75 ul/pocillo de anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa de rábano picante HRP en PBS más BSA al 0,5% y Tween20 al 0,05% a temperatura ambiente durante 30

minutos (Sidhu et al., supra). Los pocillos se lavaron con PBS – Tween20 al 0,05% por lo menos cinco veces. A continuación, se añadieron al pocillo 100 ul/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y solución B de peroxidasa (H₂O₂) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD))). La reacción se detuvo mediante la adición de 100 ul de ácido fosfórico 1 M (H₃PO₄) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD))) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La DO del color amarillo en cada pocillo se determinó utilizando un lector de placas ELISA estándar a 450 nm.

TABLA 13

F(ab)'₂	Bloqueo de 6B12
S7	-
S16	-
F5	+

- 10 [0395] La tabla 13 muestra que el anticuerpo 6B12 era capaz de bloquear el fago F(ab)'₂-F5, pero no el fago F(ab)'₂-S7 o el fago F(ab)'₂-S16. Por lo tanto, F5 se une a STOP-1 humana en la misma región N-terminal que 6B12, mientras que S7 y S17 no lo hacían.

Ejemplo 19 – Construcciones de proteínas F(ab) e IgG y expresión de proteínas

- 15 [0396] Construcciones de F(ab) para la expresión en células bacterianas: Se modificaron los fagémidos V0350-2b-S4 y V0350-2b-S7 mediante la eliminación de las secuencias virales cP3, sustituyéndolas por una secuencia terminadora que contenía 5'-GCTCGGTTGCCGCCGGGGTTTTTSTOP-1G-3' (SEQ ID NO:85), y eliminando las secuencias que codificaban la cremallera de leucina y las etiquetas gD (a continuación, pv0120-S4 y pv0120-S7, respectivamente). La figura 24C es un esquema de este vector. Los vectores pv0120 se transformaron en células E coli 34B8. Se recogieron colonias individuales y se desarrollaron en medio CRAP completo con carbenicilina
- 20 25 ug/ml a 30°C durante por lo menos 22 horas. Las proteínas expresadas se purificaron a través de una columna de alta retención de proteína G (Amersham Pharmacia).

[0397] Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican S4-Fab se muestran en las figuras 32A-G.

Construcciones de IgG para la expresión en células de mamífero:

- 25 [0398] En general, las construcciones de IgG se realizaron mediante el intercambio de la cadena ligera codificada en el vector LPG3 por la cadena ligera de S4 o S7 y mediante el intercambio de la región VH y CH1 codificada en el vector LPG4 por la región VH y CH1 de S4 o S7. La figura 24D es un esquema de los vectores LPG3 y LPG4 que codifican las cadenas ligera y pesada, respectivamente, de una proteína IgG. El vector LPG3 codifica una cadena ligera de MaE11 E27 humanizado. El vector LPG4 codifica una cadena pesada de MaE11 E27 humanizado. Juntos, codifican una versión de IgG1 humana de longitud completa de MaE11 E27 humanizado (un anticuerpo IgE). Véase, la patente de Estados Unidos 6,172,213 (Lowman) para más información sobre MaE11 E27 humanizado. Los vectores LPG3 y LPG4 fueron vectores pRK (Gorman, CM et al., (1990) DNA Protein Eng. Tech. 2:3) que se modificaron mediante, entre otras cosas, la inserción de la cadena ligera y cadena pesada de longitud completa, respectivamente, de un MaE11 E27 humanizado. Los vectores LPG3 y LPG4 se
- 30 obtuvieron de Yan Wu a Genentech, Inc., South San Francisco, CA.

- [0399] Se digirió el vector LPG4 con BsiwI y Apal para extraer las regiones variables de cadena pesada del anticuerpo MaE11 E27 humanizado. Las secuencias extraídas se sustituyeron por un fragmento BsiwI-Apal de los vectores pv0120-S4 o pv0120-S7. El vector LPG3 se digirió con EcorRV y KpnI para extraer las regiones variables de cadena ligera del anticuerpo MaE11 E27 humanizado. Las secuencias extraídas se sustituyeron por un fragmento EcorRV-KpnI de los vectores pv0120-S4 o pv0120-S7 que codifica las regiones variables de
- 40 cadena ligera de S4 y S7. Los vectores resultantes, LPG3-human kappaG6 y LPG4-human HC-S4, se describen en las figuras 35 y 36 (SEQ ID NO:110 y SEQ ID NO: 112, respectivamente). La secuencia de LPG4-human HC-S7 es la misma que la secuencia de LPG4-human HC-S4, a excepción de que la secuencia entre los sitios BsiwI-Apal es la misma que la secuencia entre los sitios BsiwI-Apal del vector pv0120-S7.

- 45 [0400] Se prepararon dsADN de LPG3-human kappaG6, LPG4-human HC-S4 y LPG4-human HC-S7 para la transfección. Se sembraron células CHO DP12 DHFR+ (ATCC) a 1,5 x 10⁶ células/ml en medios de cultivo tisular que contenía 1X Tris EDTA (TE), 2 mg/L insulina, dFBS al 1%, sulfato de gentamicina 0,15 g/L. Las células se incubaron a 37°C durante una a dos horas antes de la transfección. A continuación, se añadieron 3,5 mL de medio de cultivo tisular caliente al cultivo junto con 20 mg de ADN, 20 ml de reactivo DMRIEC (bromuro de 1,2-

dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxil etil amonio, Genentech, Inc.) y se incubaron durante por lo menos 20 minutos más a 37°C. El cultivo se añadió a un bioreactor y se añadieron 250 ml/l de medio de cultivo tisular caliente. La temperatura de cultivo celular se desplazó hasta 33°C. Después de 7-12 días, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y, a continuación, se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,2 µm. Las proteínas en el sobrenadante se purificaron a través de una columna de alta retención de proteína G (Amersham Pharmacia).

[0401] Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican una proteína IgG S4 se ilustran en las figuras 33A-F y las figuras 24A-G.

Ejemplo 20 – Medición de afinidad de Fab S4 y S7 e IgG

[0402] Se realizaron ensayos ELISA para determinar la afinidad de Fab S4 y S7 e IgG para STOP-1 humana. En primer lugar, se determinó la concentración de Fab e IG purificadas que sería óptima para utilizar en un ensayo de ELISA de competición (es decir, aproximadamente el 90% de la capacidad de unión máxima en la placa recubierta). Se cubrieron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con STOP-1 humana de longitud completa o forma corta (2 µg/ml en PBS) a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se bloquearon mediante la adición de 65 µl de BSA al 1% durante 30 minutos seguido de 40 µl de Tween20 al 1% durante otros 30 minutos. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS- Tween 20 al 0,05% 5 veces. Se añadieron concentraciones de F(ab) o IgG de 0,1 nM a 100nM diluidos en tampón ELISA (PBS – BSA al 0,5% y Tween20 al 0,05%) a los pocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS – Tween20 al 0,05% por lo menos tres veces. Se añadieron 75 µl de anticuerpo de proteína G conjugado a HRP (Amersham, dilución 1/5000 con tampón ELISA) por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS – Tween 20 al 0,05% por lo menos cinco veces. A continuación, se añadieron al pocillo 100 µl/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Peroxidasa y solución B de peroxidasa (H₂O₂) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)). La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico 1M (H₃PO₄) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la densidad óptica del color en cada pocillo utilizando un lector de placa de ELISA estándar a 450 nm. Las diluciones de Fab o IgG se representaron frente a las lecturas D. O.

[0403] La figura 19 muestra un ejemplo de un ensayo ELISA utilizado para determinar la concentración óptima de Fab o IgG en un ensayo de competición. "cubierto S" se refiere a una forma corta (#94-243) de STOP-1 que recubre en una placa de microtitulación. "cubierto F" se refiere a una forma de longitud completa de STOP-1 humana que recubre una placa de microtitulación. Aproximadamente el 90% de la unión máxima se consideró que era óptima para utilizar en un ensayo ELISA de competición.

[0404] A continuación, se realizó un ELISA de competición utilizando la concentración óptima de Fab e IgG determinada anteriormente. Se recubrieron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con STOP-1 humana de longitud completa o forma corta (2 µg/ml en PBS) a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se bloquearon mediante la adición de 65 µl de BSA al 1% durante 30 minutos seguido de 40 µl de Tween 20 al 1% durante otros 30 minutos. Los pocillos se lavaron con PBS – Tween20 al 0,05% 5 veces. En base al ensayo de unión anterior, se incubaron 50 µl de la dilución de Fab o IgG que daba lugar a aproximadamente el 90% de la unión máxima a la placa recubierta con 50 µl de varias concentraciones de STOP-1 humana de longitud completa o forma corta 0,1 a 500 nM) en una solución de tampón ELISA durante 1 hora a temperatura ambiente en un pocillo. El Fab o IgG no unidos se analizaron mediante la transferencia de 75 µl de la mezcla del pocillo a una segunda placa de 96 pocillos precubierta con STOP-1 humana de longitud completa o forma corta y la incubación de a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los pocillos de la segunda placa se lavaron con PBS – Tween 20 al 0,05% por lo menos tres veces. Se añadieron 75 µl de proteína G conjugada a HRP (dilución 1/5000 con tampón ELISA) por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS – Tween20 al 0,05% por lo menos cinco veces. A continuación, se añadieron al pocillo 100 µl/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y solución B de peroxidasa (H₂O₂)((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)). La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico 1 M (H₃PO₄) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica del color en cada pocillo se determinó utilizando un lector de placas ELISA estándar a 450 nm. Las concentraciones del STOP-1 competidor añadido se representaron frente a las lecturas de D.O. La IC₅₀ es la concentración de STOP-1 que inhibía el 50% de la unión a Fab o IgG. Véanse las figuras 20A y B. Las afinidades de unión se indican entre paréntesis.

[0405] La figura 21 es un resumen de las afinidades de unión de varios anticuerpos derivados de fagos contra STOP-1. "S/S" se refiere a un ELISA en que la placa de microtitulación se recubría con una forma corta de STOP-1 y competía con una forma corta de STOP-1. "F/S" se refiere a un ELISA en que la placa de microtitulación se recubría con una forma de longitud completa de STOP-1 humana y competía con una forma corta de STOP-1 humana. "F/F" se refiere a un ELISA en que la placa de microtitulación se recubría con una forma de longitud completa de STOP-1 y competía con una forma de longitud completa de STOP-1. Los fagos utilizados en estos estudios fueron los fagos Fab-S4 y F(ab)₂-S7.

Ejemplo 21 – Ensayo de bloqueo de S4

[0406] Se utilizó IgG S4 en un ensayo ELISA competitivo para ver si se podía bloquear la unión del fago (Fab) S4, el fago (F(ab)₂) S7, fago (Fab) S9, el fago (F(ab)₂) S16 o el el fago (F(ab)₂) F5 a una forma corta o una forma de longitud completa de STOP-1 humana.

5 [0407] En primer lugar, se recubrieron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con STOP-1 humana de longitud completa (2 ug/ml en PBS) a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se bloquearon mediante la adición de 65ul de Bsa al 1% durante 30 minutos seguido de 40 ul de Tween20 al 1% durante otros 30 minutos. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS – Tween20 al 0,05% 5 veces. Se incubaron varias concentraciones de IgG S4 (en tampón ELISA) en los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron fago (Fab) S4, fago (F(ab)₂) S7, fago (Fab) S9, fago (F(ab)₂) S16 o

10 (F(ab)₂) F5 a diferentes pocillos durante 10 minutos a una concentración que normalmente produciría una capacidad de unión del 90% en ausencia del anticuerpo IgG S4. Los pocillos se lavaron con PBS – Tween 20 al 0,05% 5 veces.

15 [0408] La union se cuantificó mediante la adición de 75 u/pocillo de anticuerpo anti-M13 conjugado conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en PBS más BSA al 0,5% y Tween20 al 0,05% a temperatura ambiente durante 30 minutos (Sidhu et al., supra). Los pocillos se lavaron con PBS – Tween20 al 0,05% por lo menos cinco veces. A continuación, se añadieron al pocillo 100 ul/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y solución B de peroxidasa (H₂O₂) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)). La reacción se detuvo mediante la adición de 100 ul de ácido fosfórico 1 M (H₃PO₄) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) a cada pocillo. La DO del color amarillo en cada pocillo se determine utilizando un lector de placas ELISA estándar a 450 nm.

20

[0409] La figura 22 muestra que la mayoría de los anticuerpos derivados de fagos, a excepción de F5, se unieron a una región similar en STOP-1 como el anticuerpo derivado de fago S4. El eje Y se refiere al porcentaje no bloqueado calculado dividiendo el valor de DO a 450 nm del pocillo que bloqueaba IgG S4 por el valor de DO 450 nm de un pocillo sin IgG S4. Los fagos analizados fueron fago S4 (Fab), fago S7 (F(ab)₂), fago S9 (Fab), fago S16 (F(ab)₂) y fago F5 (F(ab)₂). Un % menor significa un mayor bloqueo por IgG S4.

25

Ejemplo 23 – Optimizar la unión mediante la alteración de la secuencia de cadena ligera

[0410] La union de los anticuerpos se puede optimizar adicionalmente mediante, entre otros, la alteración de la secuencia de la cadena ligera. La optimización se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen métodos de expresión en fagos conocidos. Adicionalmente, la secuencia de las CDR de cadena ligera se puede cambiar mediante mutagénesis dirigida de sitio y cribar mediante ensayos ELISA similares a los métodos descritos en el ejemplo 16 anterior, a excepción de que se genera diversidad en la región variable de cadena ligera tal como se describe en la patente provisional de Estados Unidos No.. 60/385,388, presentada el 3 de junio del 2002. Véase también a continuación.

30

35 [0411] Según un ejemplo, las bibliotecas de dominios de cadena ligera variable de anticuerpo se optimizan para maximizar la diversidad en las regiones CDR, a la vez que se minimizan las perturbaciones estructurales en los dominios variables del anticuerpo. Las perturbaciones estructurales en los dominios variables de anticuerpo están asociados en general con dominios de anticuerpo plegados de forma incorrecta que dan lugar a un rendimiento bajo, por ejemplo, cuando se producen en células bacterianas. Los bajos rendimientos disminuyen el número de enlazadores detectados en el cribado. La diversidad en las regiones CDR de cadena ligera se pueden generar mediante la identificación de posiciones accesibles a disolvente y altamente diversas en cada CDR para las CDR L1, L2, L3 y el diseño de un oligonucleótido que comprende por lo menos un grupo de codones ajustados (es decir no aleatorio) que codifica variantes de aminoácidos para la posición de aminoácido correspondiente a la posición de por lo menos un residuo accesible a disolvente en una posición altamente diversa en por lo menos una región CDR. Un grupo de codones ajustados es una secuencia degenerada de

40

45 ácidos nucleicos que preferiblemente codifica los aminoácidos más habituales en las posiciones correspondientes de los residuos accesibles a disolvente en anticuerpos naturales conocidos.

[0412] Los residuos accesibles al disolvente en las CDR se pueden identificar en la molécula plantilla de dominio variable de anticuerpo mediante el análisis de la estructura cristalina de la molécula plantilla. El anticuerpo 4D5 humanizado se produce de manera eficaz y se pliega correctamente cuando se produce en una variedad de células huésped, incluyendo el cultivo de células bacterianas. La estructura cristalina de para la región variable 4D5 del anticuerpo humanizado es conocida y está disponible públicamente en <http://www.rcsb.org> (código de acceso IFVC).

50

[0413] Las posiciones accesibles al disolvente en las CDR de la cadena ligera se han identificado utilizando el programa Insight II (Accelrys, San Diego, CA).

55

[0414] Los residuos de CDR también se analizaron para determinar qué posiciones en las CDR eran altamente diversas. Las posiciones altamente diversas en las regiones CDR para las cadenas pesada y ligera se identificaron mediante el examen de las secuencias de anticuerpos naturales conocidos en la base de datos de

Kabat (Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication No. 91-3242). La base de datos de Kabat también está disponible a través de <http://www.bioinf.org.uk/abs/>. En la base de datos de Kabat, habían aproximadamente 1540 secuencias de cadena ligera pesada y 3600 secuencias para la cadena pesada humana. Los sitios CDR se alinearon y enumeraron tal como se describe por Kabat (véase <http://www.bioinf.org.uk/abs/du>). Se identificaron posiciones de aminoácidos altamente diversas mediante el revestimiento y clasificación del uso de aminoácidos, desde el utilizado más frecuentemente al utilizado menos frecuentemente para cada residuo de CDR. Por ejemplo, se encontró que L3-91 (es decir, el residuo 91 de la cadena ligera de CDR3) era Y (tirosina) en 849 de 1582 secuencias de anticuerpos en la base de datos de Kabat, y es el aminoácido hallado de manera más frecuente en esta posición. A continuación, en la lista de frecuencias, serina (que aparece en 196 secuencias), seguido de arginina (169 secuencias), alanina (118 secuencias), glicina (61 secuencias), histidina (41 secuencias), siendo las restantes 35 secuencias uno de los aminoácidos restantes. La frecuencia de aminoácidos en secuencias de cadena ligera de anticuerpo de la base de datos Kabat (que incluyen sitios diversos ilustrativos, con la correspondiente lista de diversidad de aminoácidos) se muestra en la figura 35.

[0415] Los residuos de aminoácidos hallados en una posición particular que constituyen colectivamente los aminoácidos que aparecen más frecuentemente entre las secuencias de anticuerpos naturales conocidas se puede seleccionar como la base para el diseño de bibliotecas. Los aminoácidos que aparecen más frecuentemente se estimó que eran aquellos que se hallaban más habitualmente en el 90% de las lista de los aminoácidos diversos (este grupo de aminoácidos se refiere aquí como “grupo diana de aminoácidos”). Sin embargo, tal como se describe aquí, el corte del porcentaje para un grupo diana de aminoácidos puede variar, tal como se ha descrito anteriormente, según las circunstancias y el objetivo de la biblioteca de diversidad que debe conseguirse.

[0416] Para un anticuerpo humanizado 4D5, las posiciones identificadas como accesibles a disolvente y altamente diversas fueron:

Cadena ligera

CDR1 28,29,30,31,32

CDR2 50, 53

CDR3 91, 92, 93, 94, 96

Cadena pesada

CDR1 28,30,31,32,33

CDR2 50, 52, 53, 54, 56, 58

[0417] En la figura 36 se muestran ejemplos de aminoácidos que aparecen a frecuencia elevada en diversidad natural (es decir, entre secuencia de anticuerpos natural conocidos) (referidos como “grupo diana” o “diversidad natural” en la figura 3) y la diversidad diseñada de aminoácidos por codones de ADN (“Diversidad<codón de ADN>”) para cada una de estas posiciones .

[0418] Se han diseñado un grupo de codones que codificaban un grupo específico de aminoácidos (Diversidad) para incluir por lo menos un cierto porcentaje de los aminoácidos en las secuencias naturales conocidas (designadas como “% de cubrimiento” en la figura 36). De los aminoácidos codificados por un grupo de codones, por lo menos aproximadamente el 40% de los aminoácidos pueden reconocer aminoácidos identificados para una posición particular accesible al disolvente y altamente diversas (designada como “% bueno” en la figura 36; aminoácidos codificados por un grupo de codones que son aminoácidos diana se muestran en negrita en la columna 3 de la figura 36). Sin embargo, tal como se describe aquí, el valor de % bueno puede variar según la circunstancia y objetivos. Los grupos de codones se seleccionaron, de manera que preferiblemente codificaban los aminoácidos con la mayor aparición en una posición particular. Se minimizó el número de aminoácidos no diana codificados por un grupo de codones para una posición particular. La eficacia de la selección/diseño del grupo de codones se evaluó en parte en base al valor de “% bueno”. Un porcentaje elevado significa muy pocos aminoácidos no diana; un valor elevado de “% bueno” se estimó más importante que tener más aminoácidos diana entre los aminoácidos codificados por un grupo particular de codones. La redundancia se incluyó en el cálculo del valor de “% bueno”. Para los objetivos de evaluación, también se calculó el “% de cubrimiento”. Este valor representa el porcentaje de diversidad natural cubierto por los aminoácidos “buenos” (de los aminoácidos codificados por un grupo de codones particulares). Por ejemplo, para L3-91, cuando se utiliza el grupo de codones KMT, los aminoácidos “buenos” son YSA, que es el 75% de los aminoácidos YSAD codificados por el codón. YSA son aminoácidos que cubren 1190 de 1580 secuencias de anticuerpos naturales conocidos en esta posición de aminoácido. 1190/1580 es igual al 75%, que es el valor “% de cubrimiento”. De este modo, en un

diseño que utiliza KMT en L3-91, el 75% de la biblioteca cubre el 75% de la diversidad natural en CDRL3 en la posición 91.

[0419] Los grupos de codones también se diseñaron para excluir, cuando fuera posible, cisteína y codones de parada. La presencia de residuos de cisteína tiende a causar problemas de plegamiento y los codones de parada pueden disminuir el tamaño eficaz de la biblioteca. En el diseño de los grupos de codones, también se estimó como deseable minimizar el número de aminoácidos no diana.

[0420] Los grupos de codones diseñados para cada residuo accesible a disolvente y altamente diverso de anticuerpo humanizado 4D5 se muestran en la figura 36. En cualquier residuo concreto, se podía utilizar uno o más grupos de codones dependiendo de los aminoácidos diana que se identifican. Por ejemplo, se pueden combinar dos oligonucleótidos L1, uno que contiene el codón YKG y el otro que contiene TWT en L3-96, o uno que contiene el codón DGG y el otro que contiene DHT en H2-50.

[0421] Los varios grupos de codones se podían utilizar para generar diversas bibliotecas con diversidad en una o más regiones CDR, incluyendo CDR L1, CDR L2, CDR L3. Por ejemplo, las figuras 37-40 muestran varias versiones ilustrativas de diseños de grupos de codones que se pueden utilizar para generar diversidad. La figura 36 proporciona un resumen de la cobertura de aminoácidos de estos diseños. En general, es preferible, pero no necesario, que los diseños estrechen la diversidad para cubrir más de la diversidad natural y excluyan lo máximo posible de los aminoácidos "no diana". En algunas realizaciones, un diseño que no se puntúa como más elevado en base a estos criterios se puede utilizar para obtener buenos enlazadores para un STOP-1

Ejemplo 24 - STOP-1 se une a la superficie celular de células

[0422] Se incubaron células HHT1080 con STOP-1 etiquetada con His humana de longitud completa purificada recombinante (10 ug/ml, A; 0,5 millones de células por muestra) en presencia de 100 ug/ml de anticuerpos monoclonales S7 o 6b12 en tampón FACS (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 140 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, FBS al 2%) a 4°C durante 1 hora. La unión de la proteína se detectó mediante tratamiento con FACS con anticuerpos monoclonales anti-His (5 mg/ml) o anti-Flag (5mg/ml, como control negativo) y seguido del tratamiento con anticuerpos anti-ratón de cabra conjugados a FITC.

[0423] La figura 41 muestra que STOP-1 se une específicamente a la superficie de células HeLa humanas, células de fibroblastos HT 1080 humanos y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), pero no a células 293 de riñón embrionario humano. Se cree que existe un receptor para STOP-1 en las células HeLa, HT1080 y HUVEC.

Ejemplo 25 – El anticuerpo monoclonal S7 induce la unión de STOP-1 a las células

[0424] Se incubaron células HT1080 con STOP-1 etiquetada con His humana de longitud completa purificada recombinante (10 ug/ml, A; 0,5 millones de células por muestra) en presencia de 100 ug/ml de anticuerpos monoclonales S7 o 6b12 en tampón FACS (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 140 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, FBS al 2%) a 4°C durante 1 hora. La unión de la proteína se detectó mediante tratamiento con FACS con anticuerpos monoclonales anti-His (5 mg/ml) o anti-Flag (5mg/ml, como control) seguido del tratamiento con anticuerpos anti-ratón de cabra conjugados a FITC.

[0425] La figura 42 muestra que el anticuerpo S7 potenciaba la unión de STOP-1 a la superficie celular de células HT1080, mientras que 6B12 no lo hacía. También se analizó el anticuerpo S4 en el mismo ensayo y se halló que potenciaba la unión de STOP-1 a las células HT1080. Debido a que los anticuerpos S7 y los anticuerpos S4 eran capaces de unirse a STOP-1 unida a las células, la unión del anticuerpo S7 o el anticuerpo S4 a STOP-1 no parece interferir con la unión del receptor de STOP-1 a STOP-1. De este modo. El epítipo al que el anticuerpo S7 se une en STOP-1 no parece ser necesario para la unión de STOP-1 a su receptor.

Ejemplo 26 - STOP-1 induce la migración de células endoteliales

[0426] La migración celular direccional se midió utilizando una cámara de quimiotaxis Boyden modificada (Transwells™, Corning, Inc.). Se incubaron filtros de policarbonato con poros de 8 micras con una solución al 0,1% de colágeno I de Collaborative Sciences durante la noche a 4°C. Este proceso recubrió la subsuperficie de los filtros con colágeno, una proteína de la matriz extracelular necesaria para la unión celular. El día siguiente, los filtros se enjuagaron en PBS y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con un medio de bloqueo (200 microlitros en cada cámara inferior) que consistía en medio básico de células endoteliales (Clonetics) con albúmina de suero bovino al 1% (BSA).

[0427] Se recogieron células HUVEC (de Clonetics, desarrolladas en el medio completo) utilizando una solución de disociación celular (EDTa al 0,25%) y se resuspendieron en un medio de migración (medio básico de células endoteliales que tienen BSA al 0,1%, pero no factores de crecimiento). Las células resuspendidas se colocaron en una cámara superior de la cámara Boyden modificada (10.000 células/ml, 150 microlitros/pocillo). El medio de

migración que contenía bFGF (1 ng/ml o 10 ng/ml, concentración final) o STOP-1 (1 ug/ml ó 10 ug/ml, concentración final se añadieron a la cámara inferior de la cámara Boyden modificada (300 microlitros/pocillo). Se añadió el medio de migración solo (sin bFGF o STOP-1) a las cámaras inferiores como controles. Cada condición se realizó por triplicado. Las cámaras de quimiotaxis de Boyden modificadas se colocaron en un incubador a 37°C (CO₂ al 5%) durante 3 horas.

[0428] Posteriormente, las células que no habían migrado (localizadas en la parte superior de los filtros frente a la cámara superior) se extrajeron suavemente utilizando hisopos de algodón. Los filtros se fijaron en una solución de formaldehído al 4% (10 min, temperatura ambiente) y se tiñeron con una solución de violeta cristal al 0,2% (5 min, temperatura ambiente) para visualizar las células. A continuación se contaron las células localizadas en la subsuperficie de los filtros (es decir, que migraron) utilizando un microscopio invertido Nikon. Los filtros se aleatorizaron ("cegando" el investigador a las condiciones). Se contaron las células en seis campos aleatorios (40x) por filtro, 3 filtros por condición. Los datos en la figura 44 representan el número promedio de células de un experimento representativo (de 3).

[0429] La figura 43 indica que STOP-1 es quimiotáctica (es decir, induce la migración celular) a células HUVEC. Este efecto es comparable en magnitud al de bFGF (un factor de crecimiento que se ha observado previamente que induce la migración de HUVEC y que actúa globalmente como una molécula proangiogénica). El tratamiento con bFGF y STOP-1 no mostró un efecto aditivo. Tampoco el tratamiento con bFGF o STOP-1 potencia los efectos entre sí. Los datos preliminares sugieren que la STOP-1 actúa como molécula proangiogénica o provasculogénica. El trabajo para confirmar adicionalmente este efecto incluirá la repetición del mismo experimento o uno similar utilizando un anticuerpo que bloquea la interacción de STOP-1 con células HUVEC.

Ejemplo 27 - STOP-1 se une a células MDA435

[0430] Se extrajeron células de carcinoma mamario humano MDA-MB-435 de los matraces de cultivo con EDTA 10 mM y se resuspendieron en PBS frío que contenía suero bovino fetal al 2%. El número de células se ajustó a 1.000.000 células/ml, y se dispensaron 0,5 ml de la suspensión en tubos con 10 mg/ml de STOP-1 humano de longitud completa etiquetada con flag y 100 mg/ml de anticuerpos específicos (6B12) o de control (4B7). La mezcla se incubó durante 1 hora en hielo y se lavó con tampón de suspensión frío. A continuación, la mezcla se incubó con M2-FITC anti-flag durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron en tampón de suspensión y se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo.

[0431] La figura 44 representa gráficamente el análisis de citometría de flujo. El valor de la media geométrica de la intensidad de señal producida por células tratadas con anticuerpo de detección solo (anticuerpo M2-FITC anti-flag sin STOP-1) fue de aproximadamente 7,99. Los valores de la media geométrica de las intensidades de señal producidas por las células tratadas con STOP-1 sola, STOP-1 con 6B12 y STOP-1 con 4B7 fueron aproximadamente, 13,24, 8,3 y 11,39, respectivamente. Los resultados muestran que STOP-1 se une a células de carcinoma de mama MDA-MB-435 y que 6B12, un anticuerpo monoclonal específico para STOP-1, bloquea la unión de STOP-1 a aquellas células. El isotipo de control, anticuerpo 4B7, no mostró una actividad apreciable. Los anticuerpos S4 y S7 también se utilizaron en este ensayo. Ambos anticuerpos no bloquearon la unión de STOP-1 a células MDA-MB-435, su presencia en el ensayo dio lugar a un incremento en la unión de STOP-1 a las células.

Ejemplo 28 – La expresión de ARNm de STOP-1 se sobregula por la TNFalfa y estrés celular

[0432] Los estudios previos han demostrado que las condiciones de bajo oxígeno (hipoxia) o estrés celular inducen la tumorigénesis y angiogénesis. El TNFalfa se utiliza a menudo para estimular respuestas celulares asociadas con el estrés y se ha implicado en la inducción de la angiogénesis y la tumorigénesis. Para analizar si la expresión de STOP-1 estaba influenciada por desencadenantes tumorigénicos y angiogénicos, las células HUVEC se sometieron a tratamiento con TNFalfa y condiciones hipóxicas.

[0433] Las células HUVEC se incubaron durante 3, 8 ó 24 horas con 100 ng/ml de TNFalfa recombinante humano (Genentech, Inc.) bajo condiciones hipóxicas (95% aire, 5 %CO₂) o condiciones normóxicas (aproximadamente, 95% de aire, 5% de CO₂). El ARNm de las células tratadas se extrajo y se sometió a reacciones RT-PCR TaqMan utilizando los cebadores y condiciones descritas en el ejemplo 2. El número de cambios en la expresión de ARNm de STOP-1 al final de cada periodo de tiempo se calculó mediante la comparación con su nivel de expresión después de tres horas de incubación bajo condiciones normóxicas (sin 100 ng/ml de TNFalfa).

[0434] La figura 45B muestra que la expresión de ARNm de STOP-1 se sobregula significativamente tras el tratamiento con TNFalfa bajo condiciones normóxicas. Los niveles de expresión no parecían cambiar sustancialmente en los puntos de tiempo de 3, 8 y 34 horas. La figura 45A, por otro lado, muestra que el TNFalfa presenta un efecto pequeño o no presentaba efecto en los niveles de ARNm de STOP-1 en células incubadas bajo condiciones hipóxicas. De manera destacada, en ausencia de Tnfalfa, la expresión de STOP-1 se sobreguló de manera significativa después de 34 horas de tratamiento bajo condiciones hipóxicas, pero no después de 3 horas de tratamiento. Estos resultados indican que la expresión de STOP-1 en células HUVEC es

sensible al tratamiento con TNFalfa y condiciones hipóxicas, pero la respuesta no es aditiva o sinérgica, indicando posiblemente mecanismos de acción similares.

CLAVES DEL LISTADO DE SECUENCIAS

[0435]

5

Seq ID No.	Descripción
1	DNA76393-1664
2	Secuencia de aminoácidos de DNA76393-1664
3	Secuencia de aminoácidos de STOP-1 alternativa
4	Secuencia de aminoácidos de STOP-1 de ratón
5	Secuencia de aminoácidos de STOP-1 de pez del arroz
6	Secuencia de aminoácidos de STOP-1 de pez cebra
7	Secuencia de aminoácidos de STOP-1 de pollo
8	S7 - primera secuencia de aminoácidos
9	S7 - segunda secuencia de aminoácidos
10	S7 - tercera secuencia de aminoácidos
11	S16 - primera secuencia de aminoácidos
12	S16 - segunda secuencia de aminoácidos
13	S16 - tercera secuencia de aminoácidos
14	F5 - primera secuencia de aminoácidos
15	F5 - segunda secuencia de aminoácidos
16	F5 - tercera secuencia de aminoácidos
17	S4 - primera secuencia de aminoácidos
18	S4 - segunda secuencia de aminoácidos
19	S4 - tercera secuencia de aminoácidos
20	S9 - primera secuencia de aminoácidos
21	S9 - segunda secuencia de aminoácidos
22	S9 - tercera secuencia de aminoácidos
23	Sonda de hibridación de RT-PCR
24	Cebador sentido de RT-PCR
25	Cebador antisentido de RT-PCR
26	Secuencia plantilla
27	Secuencia de cebador
28	Secuencia de cebador
29	Secuencia de cebador
30	Secuencia de cebador

31	Secuencia de cebador
32	Secuencia de cebador
33	Secuencia de cebador
34	Secuencia de cebador
35	Secuencia de cebador
36	Secuencia de cebador
37	Secuencia de cebador
38	Secuencia de cebador
39	Secuencia de cebador
40	Secuencia de cebador
41	Secuencia de cebador
42	Secuencia de cebador
43	Secuencia de cebador
44	Secuencia de cebador
45	Secuencia de cebador
46	Secuencia de cebador
47	Secuencia de cebador
48	Secuencia de cebador
49	Secuencia de cebador
50	Secuencia de cebador
51	Secuencia de cebador
52	Secuencia de cebador
53	Secuencia de cebador
54	Secuencia de cebador
55	Secuencia de cebador
56	Secuencia de cebador
57	Secuencia de cebador
58	Secuencia de cebador
59	Secuencia de cebador
60	Secuencia de cebador
61	Secuencia de cebador
62	Secuencia de cebador
63	Secuencia de cebador
64	Secuencia de cebador
65	Secuencia de cebador

66	Secuencia de cebador
67	Secuencia de cebador
68	Secuencia de cebador
69	Secuencia de cebador
70	Secuencia de cebador
71	Secuencia de cebador
72	Secuencia de cebador
73	Secuencia de cebador
74	Secuencia de cebador
75	Secuencia de cebador
76	Secuencia de cebador
77	Secuencia de cebador
78	Secuencia de cebador
79	Secuencia de cebador
80	Secuencia de cebador
81	Secuencia de cebador
82	Secuencia de cebador
83	Secuencia de cebador
84	Cremallera de leucinas GCN4
85	Oligo que contiene secuencia de terminación
86	una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de Fab anti-Her-2
87	una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de Fab anti-Her-2
88	Una secuencia de ácidos nucleicos de un fagémido que codifica las SEQ ID NOS: 86 y 87 (pv0350-2b)
89	una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de F(ab) ₂ anti-Her-2
90	una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de F(ab) ₂ anti-Her-2
91	Una secuencia de ácidos nucleicos de un fagémido que codifica las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS:89 y 90 (pv0350-4)
92	una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S4-Fab
93	una secuencia de aminoácidos que comprende una región de caedna pesada de S4-Fab
94	una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS:92 y 93
95	una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S9-Fab
96	una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de S9-Fab
97	una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS:95 y 96
98	una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S7-F(ab) ₂

99	una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de S7-F(ab) ₂
100	una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs:98 y 99
101	una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S16-F(ab) ₂
102	una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de S16-F(ab) ₂
103	una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs:101 y 102
104	una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de F5-F(ab) ₂
105	una secuencia de aminoácidos que comprende una región de caedna pesada FS-F(ab) ₂
106	una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 104 y 105
107	una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de S4-Fab
108	una secuencia de aminoácidos que comprende una región de cadena pesada de S4-Fab
109	Una secuencia de ácidos nucleicos de un vector que codifica la secuencia de aminoácidos si SEQ ID No: 07 y 108 (pv0120-S4)
110	Una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena ligera de IgG S4
111	Una secuencia de ácidos nucleicos de un vector que codifica la secuencia de aminoácidos de Seq ID No: 110 (LPG3.Human kappaG6)
112	Una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena pesada de IgG S4
113	Una secuencia de ácidos nucleicos de un vector que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 112 (LPG4.HumanHC-S4)
114	Secuencia de aminoácidos consenso de la figura 1
115	Una secuencia consenso H2
116	Una secuencia consenso H3
117	Secuencia de polipéptido

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal que se une específicamente a los aminoácidos 33-52 ó 33-53 de STOP-1 humana mostrada en la figura 2, en el que el anticuerpo bloquea la unión de STOP-1 a las células.
- 5 2. Anticuerpo monoclonal que se une específicamente a los aminoácidos 94-243 de STOP-1 humana mostrada en la figura 2, en el que el anticuerpo potencia la unión de STOP-1 a las células.
3. Anticuerpo monoclonal, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo monoclonal se une a una forma oligomérica de STOP-1 humana.
4. Anticuerpo monoclonal, según la reivindicación 1, que comprende (a) una primera secuencia de aminoácidos TINNYD; (b) una segunda secuencia de aminoácidos GYISPPSGATY; y (c) una tercera secuencia de aminoácidos CARMVGMRRGVMDY, en el que la primera secuencia de aminoácidos está en los residuos 28-33 de una cadena pesada según el sistema de numeración Kabat, la segunda secuencia de aminoácidos está en los residuos 49-58 de una cadena pesada según el sistema de numeración Kabat y la tercera secuencia de aminoácidos está en los residuos 92-102 de una cadena pesada según el sistema de numeración Kabat, o una variante de dicho anticuerpo que se une a STOP-1; o que se produce mediante la línea celular de hibridoma 6B12.1.7 depositada el 28 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-5104.
- 10 15 5. Anticuerpo monoclonal, según la reivindicación 2, que comprende:
 - (a) la primera secuencia de aminoácidos TISGSD; (b) la segunda secuencia de aminoácidos GRISPYGGNTN; y (c) la tercera secuencia de aminoácidos CARVGGLKLLFDY; o (a) la primera secuencia de aminoácidos TITNSD; (b) la segunda secuencia de aminoácidos ATIYPYGGYTY; y (c) la tercera secuencia de aminoácidos CARGGGMDGYVMDY; o (a) la primera secuencia de aminoácidos TISGSW; (b) la segunda secuencia de aminoácidos AWIAPYSGATD; y (c) la tercera secuencia de aminoácidos CAREGGLYWVFDY; o (a) una primera secuencia de aminoácidos TISNYG; (b) una segunda secuencia de aminoácidos GRISPSNGSTY; y (c) una tercera secuencia de aminoácidos CAKCSVRFAY,
 - 20 en el que la primera secuencia de aminoácidos está en los residuos 28-33 de una cadena pesada según el sistema de numeración Kabat, la segunda secuencia de aminoácidos está en los residuos 49-58 de una cadena pesada según el sistema de numeración Kabat y la tercera secuencia de aminoácidos está en los residuos 92-102 de una cadena pesada según el sistema de numeración Kabat, o una variante de dicho anticuerpo que se une a STOP-1.
- 30 6. Anticuerpo monoclonal, según la reivindicación 4 ó 5, en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de:
 - (a) la secuencia de cadena pesada de la figura 27;
 - (b) la secuencia de cadena pesada de la figura 28;
 - (c) la secuencia de cadena pesada de la figura 29;
 - 35 (d) la secuencia de cadena pesada de la figura 30;
 - (e) la secuencia de cadena pesada de la figura 31; o
 - (f) la secuencia de cadena pesada de la figura 34; o una variante de dicho anticuerpo que se une a STOP-1.
7. Anticuerpo monoclonal, según la reivindicación 6, que comprende además la secuencia de aminoácidos de:
 - (a) la secuencia de cadena ligera de la figura 27; o
 - 40 (b) la secuencia de cadena ligera de la figura 33; o una variante de dicho anticuerpo que se une a STOP-1.
8. Anticuerpo monoclonal que se une específicamente a STOP-1 humana mostrada en la figura 2 que tiene una característica biológica de un anticuerpo:
 - (i) en el que el anticuerpo se une específicamente a los aminoácidos 94-243 de STOP-1 humana y tiene una característica biológica de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en S7 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5090, y S4 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5086, en el que la característica biológica es la capacidad de potenciar la unión de STOP-1 a células; o
 - 45 (ii) en el que el anticuerpo se une específicamente a los aminoácidos 33-52 ó 33-53 de STOP-1 humana y tiene una característica biológica de un anticuerpo 6B12 producido por la línea celular de hibridoma 6B12.1.7
 - 50

depositada el 28 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5104, en el que la característica biológica es la capacidad de bloquear la unión de STOP-1 a las células.

9. Anticuerpo monoclonal que se une específicamente a STOP-1 humana mostrada en la figura 2, en el que la unión del anticuerpo a STOP-1 se puede inhibir por un segundo anticuerpo monoclonal:

- 5 (i) en el que el anticuerpo se une específicamente a los aminoácidos 94-243 de STOP-1 humana y el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en S7 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5090, S4 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5086, S9 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5087 y S16 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5089; o

- 15 (ii) en el que el anticuerpo se une específicamente a los aminoácidos 33-52 ó 33-53 de STOP-1 humana y el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en F5 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5088 y 6B12 producido por la línea celular de hibridoma 6B12.1.7 depositada el 28 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5104.

- 20 10. Anticuerpo monoclonal, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de cadena ligera y pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en F5 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5088 y 6B12 producido por la línea celular de hibridoma 6B12.1.7 depositada el 28 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5104, y variantes de los mismos que se unen a STOP-1.

- 25 11. Anticuerpo monoclonal, según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de cadena ligera y pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en (i) S7 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 25 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5090, S4 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 28 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5086, S9 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 28 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5087 y S16 codificado por la molécula de ácido nucleico depositada el 28 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5089, y variantes de los mismos que se unen a STOP-1.

12. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, o un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo biespecífico.

- 35 13. Anticuerpo, según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo está conjugado a un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico, un agente de detección, un agente que mejora la biodisponibilidad y un agente que mejora la semivida del anticuerpo.

14. Anticuerpo, según la reivindicación 13, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en una toxina, un antibiótico y un isótopo radioactivo.

- 40 15. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho anticuerpo se produce en bacterias o células CHO.

16. Molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que tiene una secuencia tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4-7 y 10-12.

17. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 16.

- 45 18. Célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 16.

19. Composición que comprende el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

20. Composición que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 16.

- 50 21. Composición que comprende el anticuerpo monoclonal, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6(e), 8(ii), 9(ii) y 10, en la que el anticuerpo bloquea la unión de STOP-1 a las células y un portador farmacéuticamente aceptable.

22. Composición, según la reivindicación 21, que comprende además un agente de reconocimiento estromal seleccionado entre un anticuerpo que se une específicamente a proteína de activación de fibroblastos (FAP), fascina, HSP47, mesotelina o antígeno de células madre de próstata.

23. Composición, según la reivindicación 22, en la que el agente de reconocimiento estromal está unido covalentemente al anticuerpo monoclonal.
24. Composición, según la reivindicación 22 ó 23, en la que el agente de reconocimiento estromal reconoce una célula estromal de un tumor.
- 5 25. Composición que comprende el anticuerpo monoclonal, según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 5, 6(a)-(d)(f), 7, 8(i), 9(i) y 11, en la que el anticuerpo potencia la unión de STOP-1 a células y un portador farmacéuticamente aceptable.
26. Método para producir un anticuerpo anti-STOP-1 que comprende la etapa de cultivar una célula que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 16.
- 10 27. Método, según la reivindicación 26, en el que la célula es una célula bacteriana o una célula de mamífero.
28. Método para determinar la presencia de un polipéptido STOP-1 en una muestra que comprende exponer una muestra sospechosa de contener el polipéptido STOP-1 a un anticuerpo anti-STOP-1, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y determinar la unión de dicho anticuerpo a un componente de dicha muestra.
- 15 29. Método de diagnóstico o monitorización de un tumor de un paciente que comprende la etapa de comparar la cantidad de proteína STOP-1 en un tejido normal con la cantidad de proteína STOP-1 en un tejido de prueba obtenido del paciente utilizando el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 to 12.
30. Método, según la reivindicación 29, en el que la cantidad de STOP-1 en el tejido normal y el tejido tumoral se evalúa en base a la expresión en células estromales.
- 20 31. Anticuerpo monoclonal, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6(e), 8(ii), 9(ii) y 10, en el que el anticuerpo bloquea la unión de STOP-1 a células para utilizar en un método de inhibición del crecimiento de un tumor que sobreexpresa STOP-1, comprendiendo el método administrar a un paciente dicho anticuerpo en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento del tumor en el paciente.
- 25 32. Utilización de un anticuerpo monoclonal, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6(e), 8(ii), 9(ii) y 10, en la que el anticuerpo bloquea la unión de STOP-1 a células en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de un tumor que sobreexpresa STOP-1.
33. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en la que el anticuerpo bloquea la unión de STOP-1 a células para utilizar en un método de inhibición del crecimiento de un tumor que sobreexpresa STOP-1, comprendiendo el método administrar a un paciente dicho anticuerpo en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento del tumor en el paciente.
- 30 34. Anticuerpo monoclonal para utilizar, según la reivindicación 31, la utilización, según la reivindicación 32, o la composición para utilizar, según la reivindicación 33, en los que el tumor tiene compartimentos estromales.
- 35 35. Anticuerpo monoclonal para utilizar, según la reivindicación 31, la utilización, según la reivindicación 32, o la composición para utilizar, según la reivindicación 33, en los que el tumor se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinomas, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de endometrio, glioma y cáncer pancreático.
36. Artículo de fabricación, que comprende:
- (a) una composición de materia, según la reivindicación 21, en la que el anticuerpo bloquea la unión de STOP-1 a las células;
- (b) un recipiente que contiene dicha composición; y
- 40 (c) una etiqueta fijada a dicho recipiente, o un prospecto incluido en dicho recipiente que se refiere a la utilización de dicha composición en el tratamiento de un trastorno proliferativo.
- 45 37. Anticuerpo monoclonal, según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 5, 6(a)-(d)(f), 7, 8(i), 9(i) y 11, en el que el anticuerpo potencia la unión de STOP-1 a las células para utilizar en un método de inducción de la angiogénesis en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo.
38. Utilización de un anticuerpo monoclonal, según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 5, 6(a)-(d)(f), 7, 8(i), 9(i) y 11, en la que el anticuerpo potencia la unión de STOP-1 a células en la fabricación de un medicamento para inducir la angiogénesis en un paciente.

39. Composición, según la reivindicación 25, en la que el anticuerpo potencia la unión de STOP-1 a células para utilizar en un método de inducción de la angiogénesis en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo.

40. Artículo de fabricación, que comprende:

- 5 (a) una composición de materia, según la reivindicación 25, en la que el anticuerpo potencia la unión de STOP-1 a las células;
 - (b) un recipiente que contiene dicha composición; y
 - (c) una etiqueta fijada a dicho recipiente, o un prospecto incluido en dicho recipiente que se refiere a la utilización de dicha composición en el tratamiento o mejora de una enfermedad que se beneficiaría de una angiogénesis incrementada.
- 10



FIG.-2

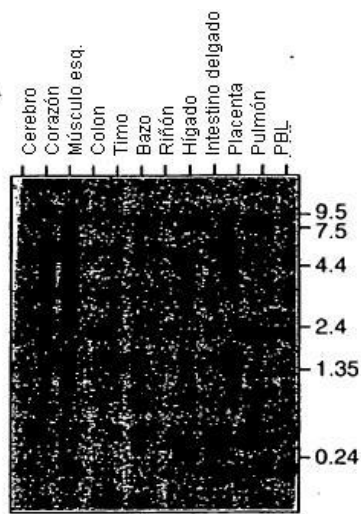


FIG. 3A

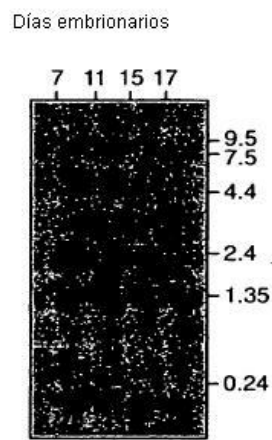


FIG. 3B

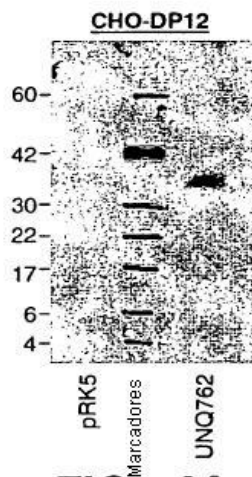


FIG. 4A

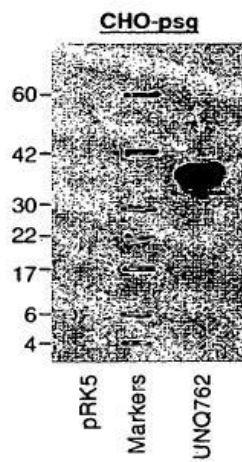


FIG. 4B

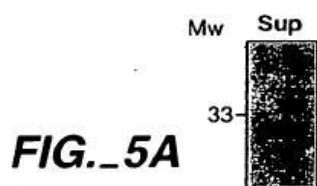


FIG. 5A



FIG. 5B

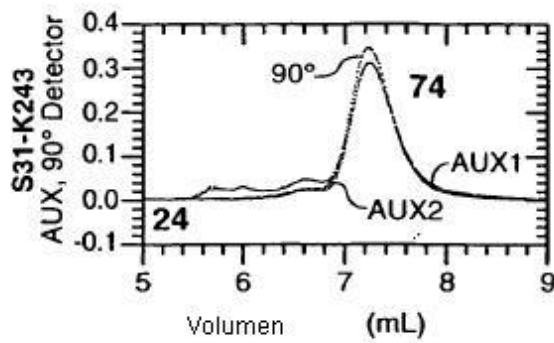


FIG. 6A

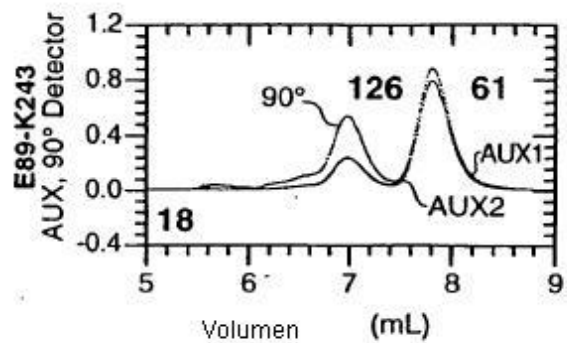


FIG. 6B

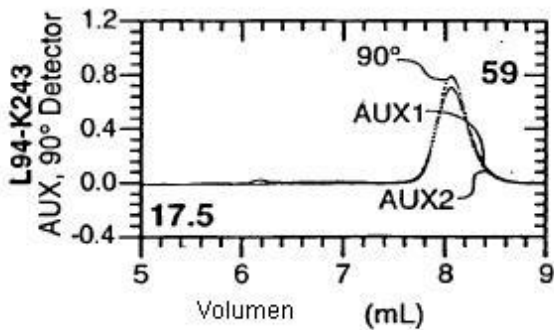


FIG. 6C

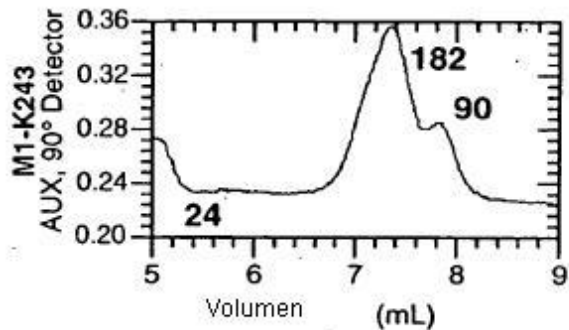


FIG. 7A

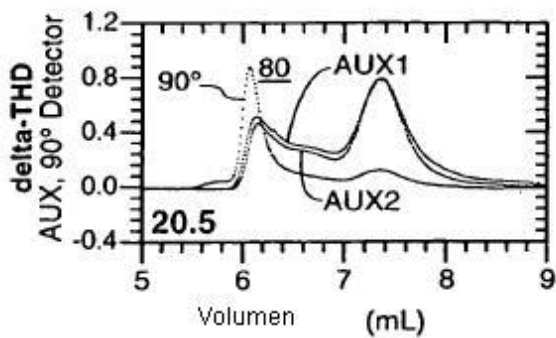


FIG. 7B

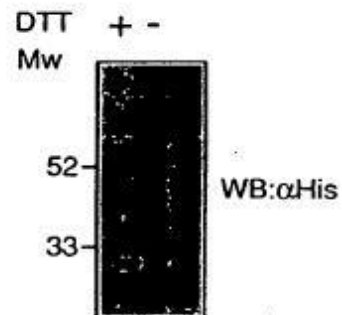


FIG. 7C

FIG._8A

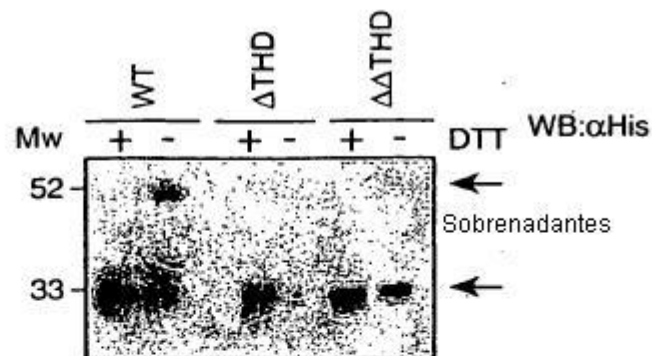


FIG._8B

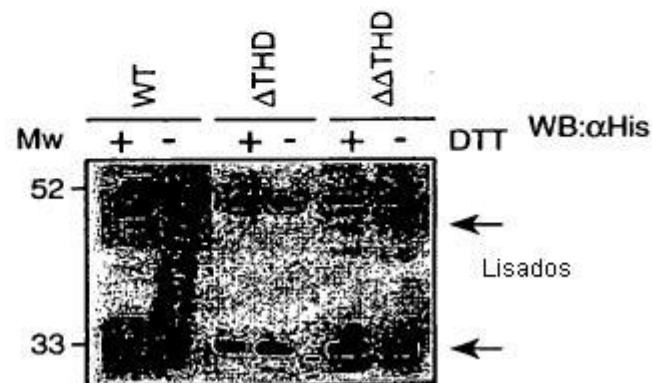


FIG._9A

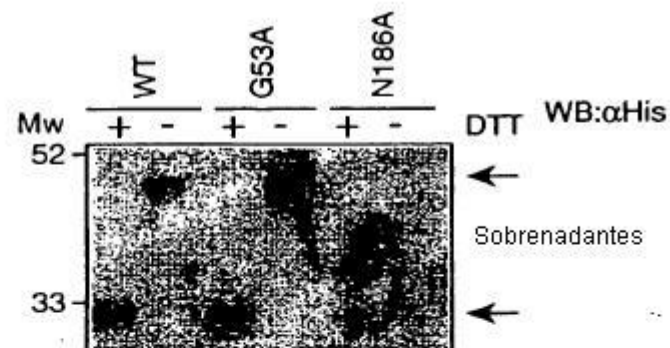


FIG._9B

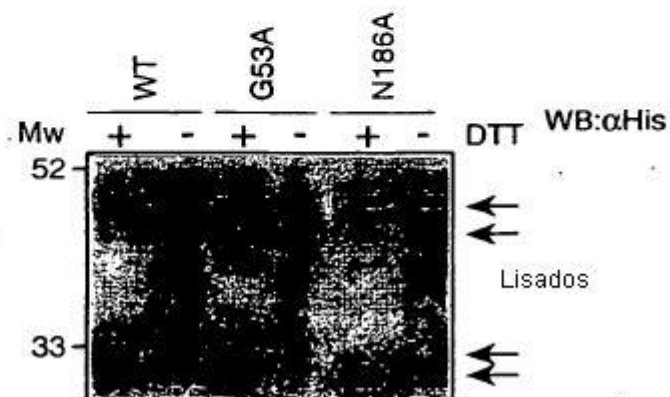


FIG._10A

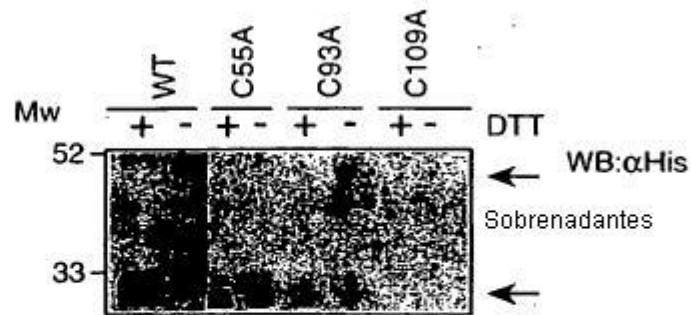


FIG._10B

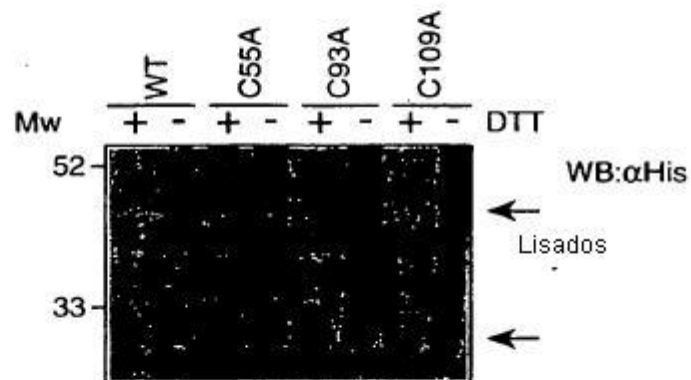
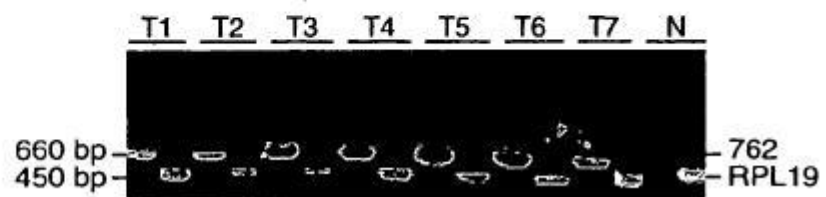


FIG._11



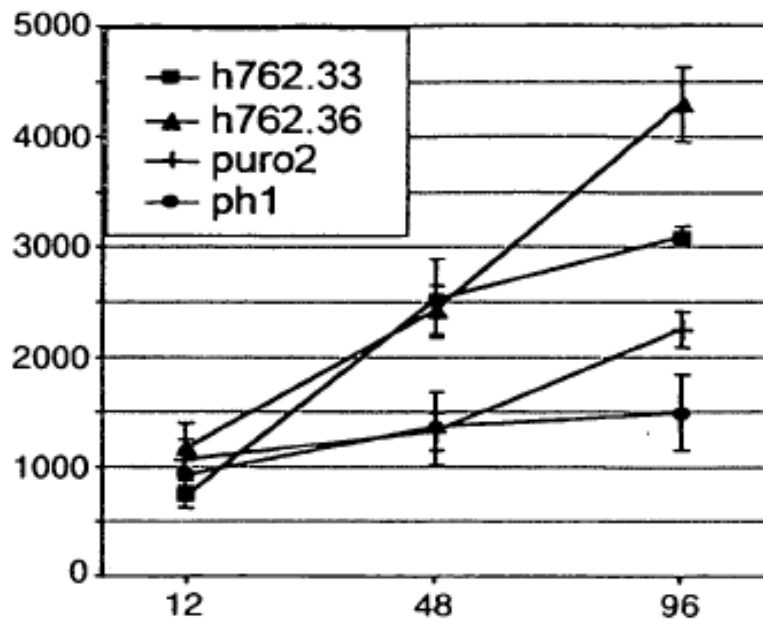


FIG. 12A

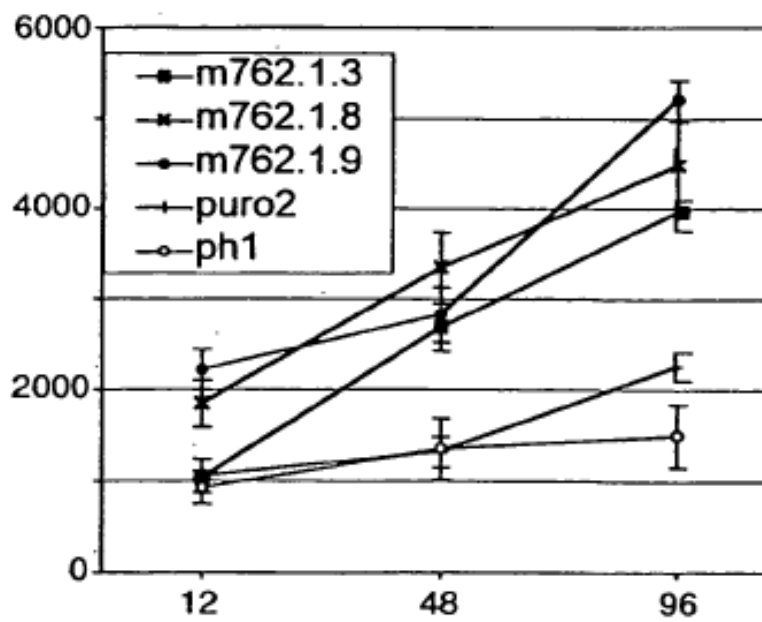


FIG. 12B

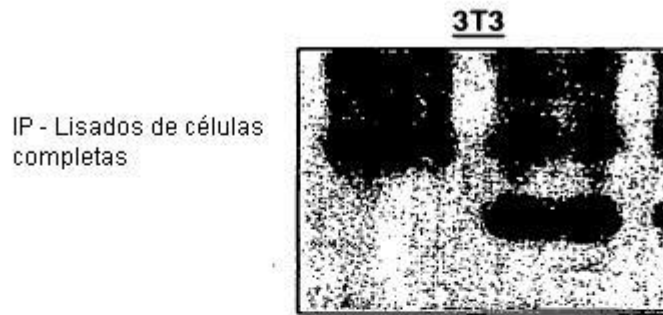


FIG._13A

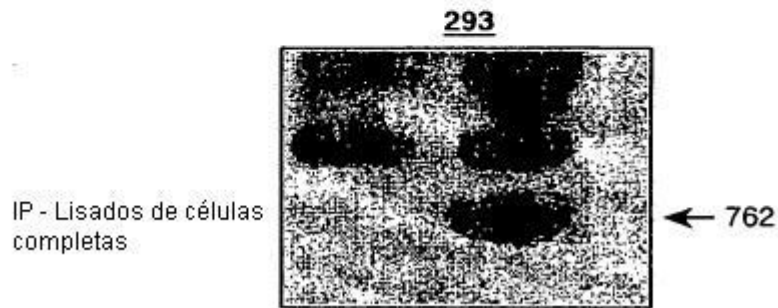


FIG._13B

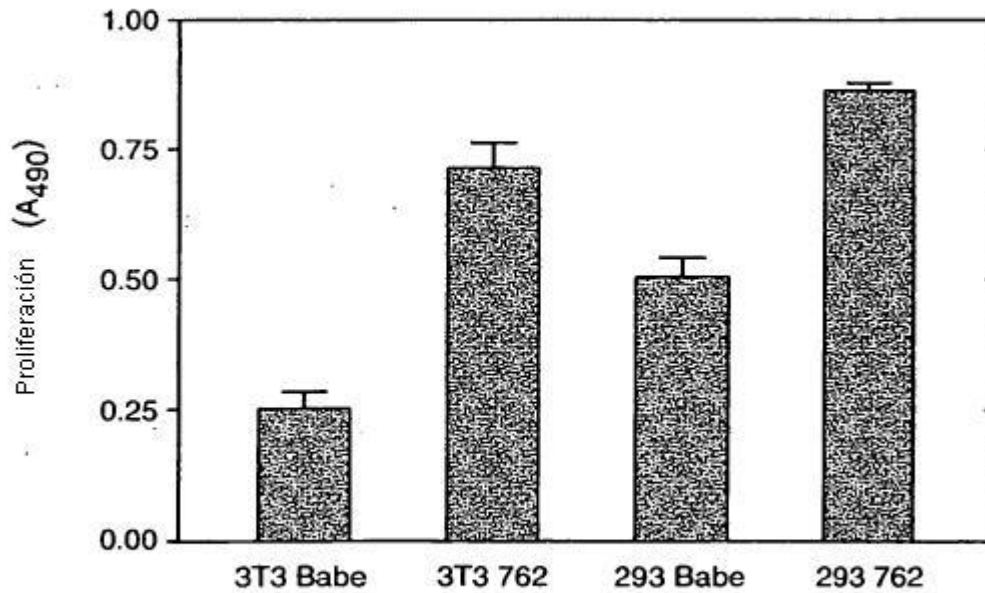


FIG._13C

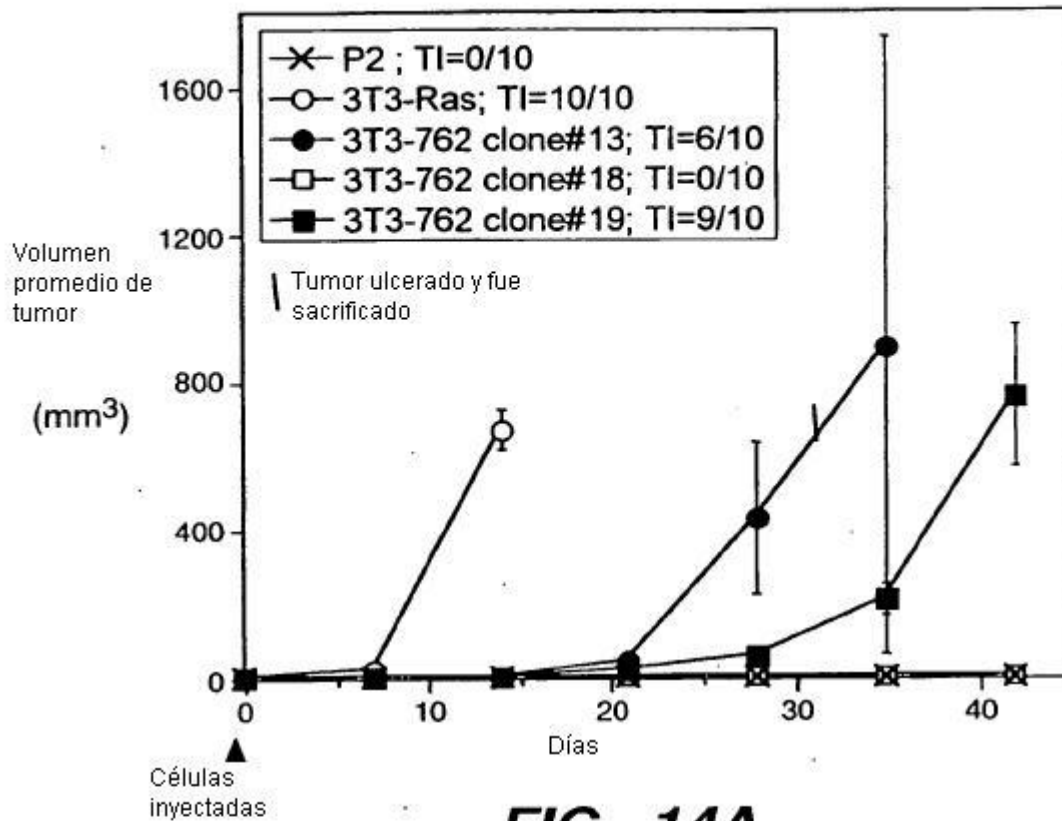


FIG. 14A

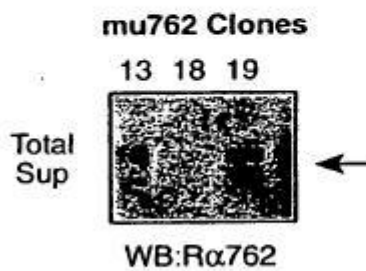


FIG. 14B

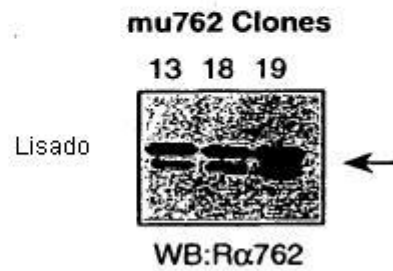


FIG. 14C

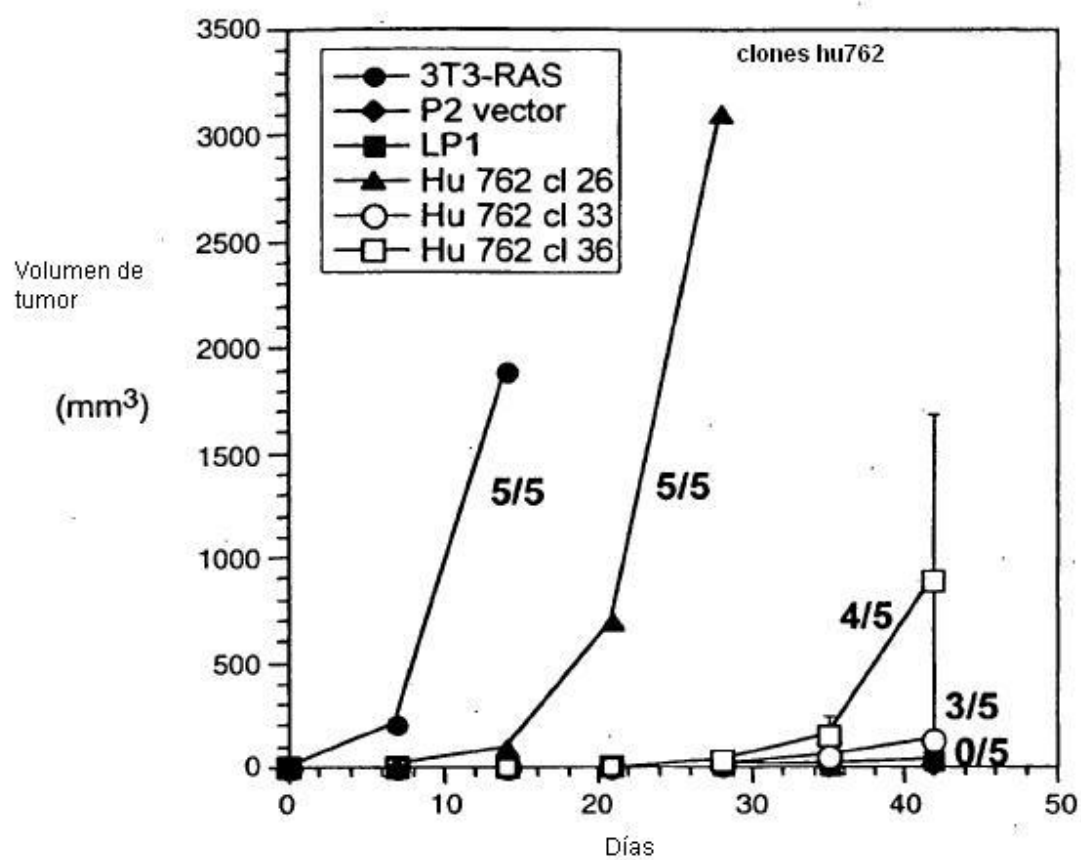
**FIG. 15**



FIG._16A



FIG._16C

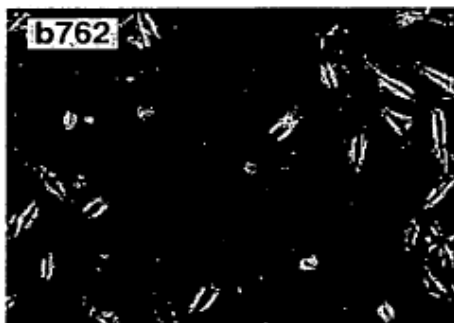


FIG._16B

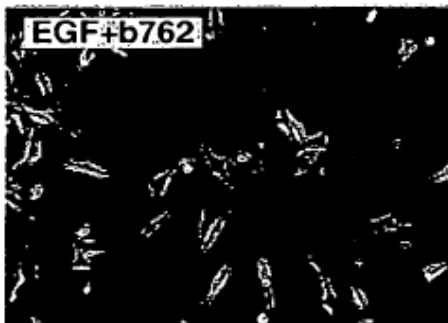


FIG._16D

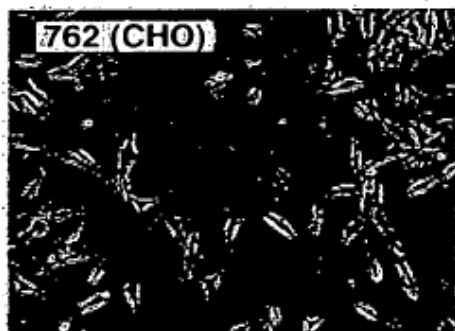


FIG._16E

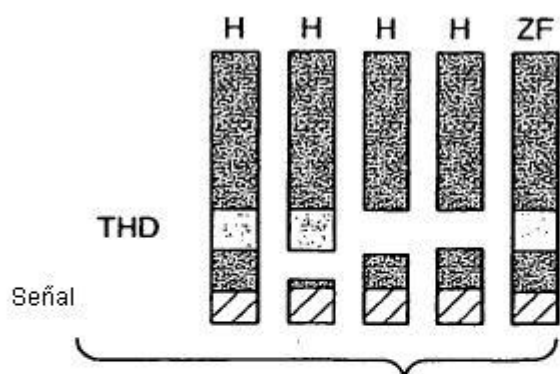


FIG._17A

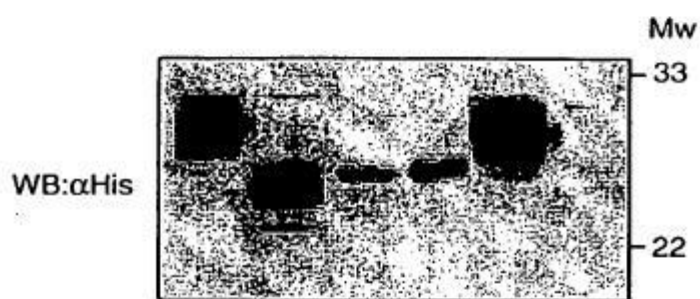


FIG._17B

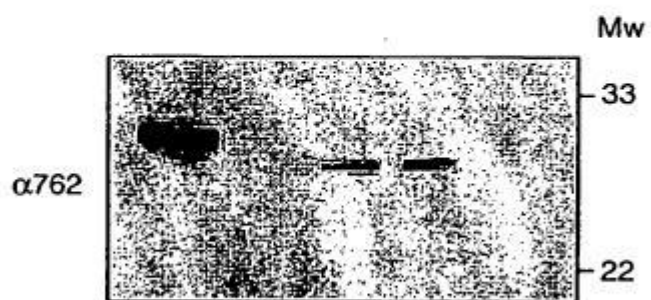


FIG._17C

HI										H2										H3										Nombre	
28	29	30	31	32	33	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	S7
T	I	S	G	S	D	G	R	I	S	P	Y	G	G	N	T	N	C	A	R	V	G	G	L	K	L	L	-	F	D	Y	S7
T	I	T	N	S	D	A	T	I	Y	P	Y	G	G	Y	T	Y	C	A	R	G	G	M	D	G	Y	V	M	D	Y	S16	
T	I	N	N	Y	D	G	Y	I	S	P	P	S	G	A	T	Y	C	A	R	M	V	G	M	R	R	G	V	M	D	Y	F5
T	I	N	N	Y	D	G	Y	I	S	P	P	S	G	A	T	Y	C	A	R	M	V	G	M	R	R	G	V	M	D	Y	F6
T	I	S	G	S	W	A	W	I	A	P	Y	S	G	A	T	D	C	A	R	E	G	G	L	Y	W	V	-	F	D	Y	S4
T	I	S	N	Y	G	G	R	I	S	P	S	N	G	S	T	Y	C	A	K	C	S	V	R	-	-	-	-	F	A	Y	S9
T	I	S	G	S	W	A	W	I	A	P	Y	S	G	A	T	D	C	A	R	E	G	G	L	Y	W	V	-	F	D	Y	F13
T	I	S	G	S	W	A	W	I	A	P	Y	S	G	A	T	D	C	A	R	E	G	G	L	Y	W	V	-	F	D	Y	F47

FIG._18

Fago			Fab			IgG		
762 S/S	762 F/F		762 S/S	762 F/S	762 F/F	762 S/S	762 F/F	
3nM	0.9nM		3.6nM (1.9nM)	32nM	13.4nM	0.5nM	3.1nM	
762 S/S	762 F/F		762 S/S	762 F/S	762 F/F	762 S/S	762 F/F	
35nM	2.7nM		113nM	57nM	n/a	7.3nM	41nM	
S4								
S7								

FIG. 21

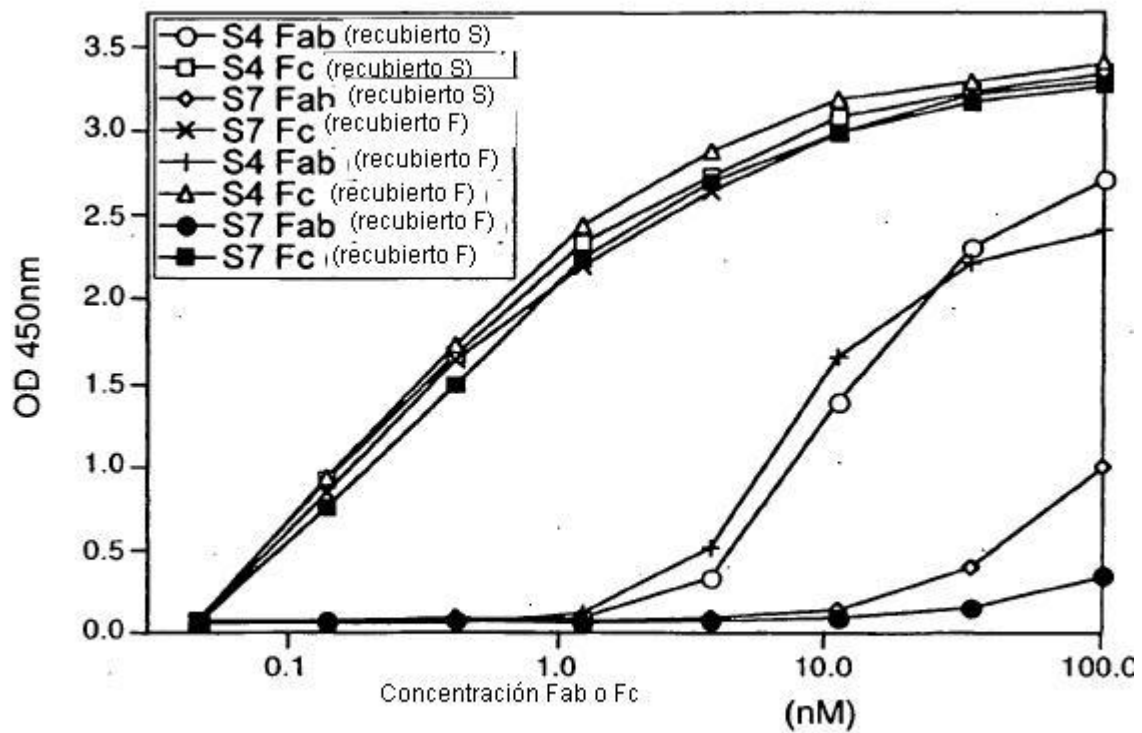


FIG. 19

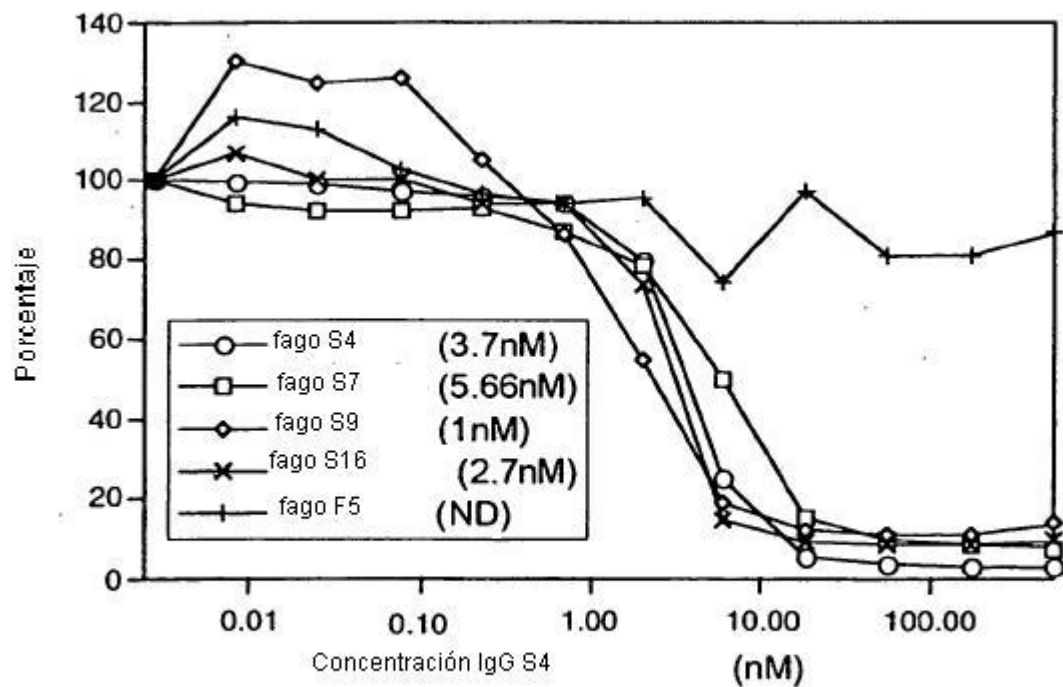


FIG. 22

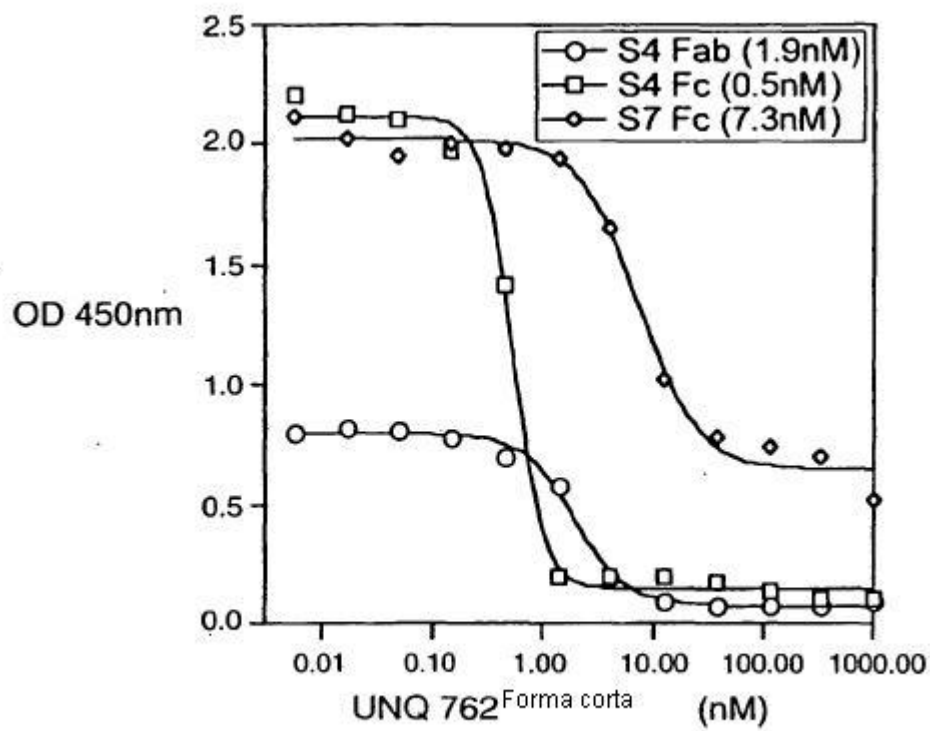


FIG. 20A

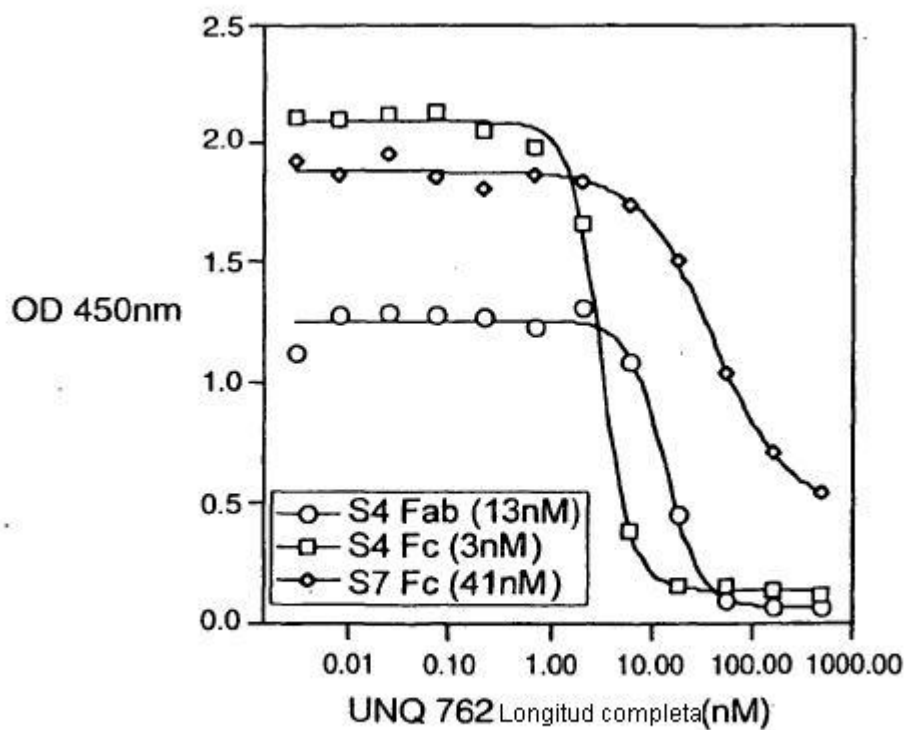


FIG. 20B

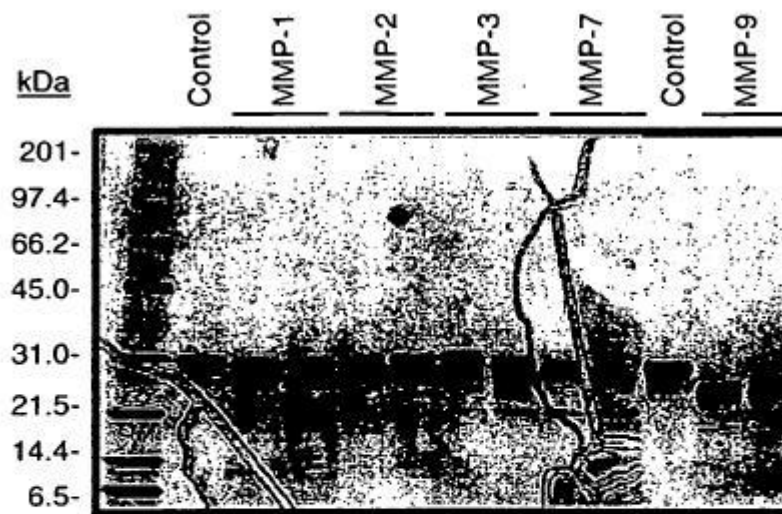


FIG._23

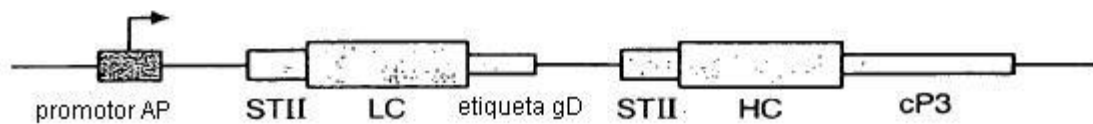


FIG._24A

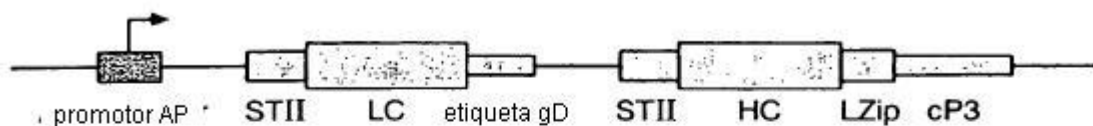


FIG._24B

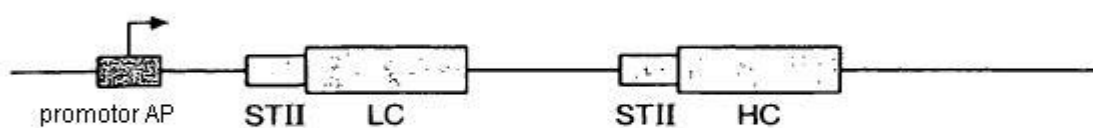


FIG._24C

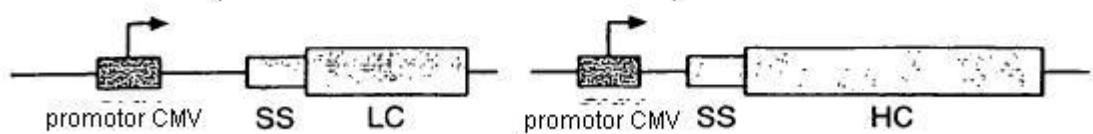


FIG._24D

```

1 GAATTCAACT TCTCCNACT TTGGATAAGG AATACAGAC ATGAAAAATC TCATTGCTGA GTTGTATTTT AAGCTTCCCC AAAAAGAAGA AGAGTCGAAT
CTTAAGTTGA AGAGGTATGA AACCTATTCC TTTATGTCTG TACTTTTITAG AGTAACGACT CAACAATAAA TTCGAACGGG TTTTCTTCT TCTCAGCTTA

101 GAACTGTGTG CCGAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCTCA CTCGAATGCT TCGCAATATG GCGCAAAATG ACCAACACGG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG
CTTGACACAC GCGTCCATCT TCGAAACCTC TAATAGCAGT GAGGTACGA AGCCTTATAC CGCGTTTITAC TGGTTGTGCG CAACTAATA GTCCATCTCC

201 GGGCGCTGTA CGAGGTAAG CCGGATGCCA GCATTCTGA CGAGCATAGG GAGGTGCTGC GCGATTACGT AAAGAACTTA TTGAAGCATC CTCGTCAGTA
CCCGGACAT GTCCATTTC GGGCTACGGT CGTAAGACT GTGCTATGC CTCGACGAGC CGTATATGCA TTTCTTCAAT AACTTCGTAG GAGCAGTCAT

301 AAAAGTTAAT CTTTCAACA GCTGTCATAA AGTGTGACG GCGGAGACTT ATGTCGCTT TGTITTTTAT TTTTAATGTA TTGTAACTA GTACGCAAGT
TTTTCAAATA GAAAAGTTGT CGACAGTATT TCAACAGTGC CGGCTCTGAA TATCAGCGAA ACNAAAATAA AAAATTACAT AAACATTGAT CATGCGTTCA

401 TCACGTAANA AGGTATGTA GAGGTGAGG TGATTTTATG AAAAGNATA TCGCATTTCT TCTTGCATCT ATGTTCTGTT TTTCTATTGC TACAAATGCC
AGTGCATTTT TCCCATACAT CTCCTACTCC ACTAAATAC TTTTCTTAT AGCTAAAGA AGAAGTAGA TACNAGCAAA AAAGATAACG ATGTTTACGG
1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A
*inicio secuencia serial still
*met

501 TATGCAGATA TCCAGATGAC CCAGTCCCG AGCTCCCTGT CCGCTCTGT GGGGATAGG GTCACATCA CCTGCCGTC CAGTCAGGAT GTGTCCACTG
ATACCTCTAT AGGTCTACTG GGTGAGGGG TCGAGGGACA GCGGGAGACA CCCCTATCC CAGTGTAGT GGACGGGACG GTCAGTCCTA CACAGGTGAC
22 Y A D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A
*inicio cadena ligera
*CDR-L1

601 CTGTAGCCTG GTATCAACAG AACCCAGGAA AAGCTCCGAA GCTTCTGATT TACTCGGCAT CCTTCTCTA CTCTGGAGTC CCTTCTCGCT TCTCTGGTAG
GACATCGGAC CATAGTTGTC TTTGTCTCTT TTCGAGGCTT CGAAGACTAA ATGAGCCGTA GGAAGAGAT GAGACCTCAG GGAAGAGCGA AGAGCCATC
56 V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S
*CDR-L2

701 CGGTCCGGG ACGGATTICA CTCTGACCAT CAGCAGTCTG CAGCCGGAG ACTCGCAAC TTATACTGT CAGCAATCTT ATACTACTCC TCCCAGTTTC
GCCAAGGCCC TGCCTAAAGT GAGACTGGTA GTCGTAGAC GTCGGCTTC TGAAGCGTTG AATAATGACA TATGATGAGG AGGTGCAAG
89 G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F
*CDR-L3

```

FIG. 25A

801 GGACAGGGTA CCAAGGTGGA GATCAAAAGA ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTCACTCTC CGGCATCTG ATGAGCAGTT GAATCTGGA ACTGCCTCTG
 CCTGTCCCAT GGTCCACCT CTAGTTTGCT TGACACCGAC GTGGTAGACA GAATAGAG GCGGTAGAC TACTCGTCAA CTTAGACCT TGACGGAGAC
 122 G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
 901 TTGTGTGCT GCTGANTAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA AGTACAGTGG AAGTGGATA AGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCAGGAGA GTGTCACAGA
 AACACACGGA CGACTTATTG AAGTAGGGT CTCTCGGTT TCATGTCACC TTCCACCTAT TGCGGAGGT TAGCCCATG AGGTCTCTCT CACAGTGTCT
 156 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E
 1001 GGAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC CTGACGCTGA GCAAGCAGA CTACAGAAA CACAAGTCT ACGCTGCGA AGTCACCCAT
 CCGCTCTGCG TTCTGTGCTG GTGATGCGGA GTCGTGCTGG GACTCGGACT CGTTTCGTCT GATGCTCTTT GTGTTTCAGA TGCGGACGCT TCAGTGGGTA
 189 Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
 1101 CAGGGCCTGA GTCGCCCGT CACAAGAGC TTCAACAGG GAGAGTGTGG TGCCAGCTCC GGTATGGCTG ATCCGAACCG TTTCGCGGT AAGGACCTGG
 GTCGCCGACT CGAGCGGCA GTGTTTCTCG AAGTTGTCCC CTCTCACACC ACGTTCGAGG CCATACCGAC TAGGTTGGC AAAGCGCCA TTCCTGGACC
 222 Q G L S S P V T K S F N R G E C G A S S G M A D P N R F R G K D L A
 *fin de cadena ligera , inicio de etiqueta gD
 1201 CATAACTCGA GGCTGATCCT CTACGCCGGA CGCATCGTGG CCCTAGTAGC CAAGTTACG TAAAAAGGT AACTAGAGGT TGAGGTGATT TTATGAAAAA
 GTATTGAGCT CCGACTAGGA GATGCGCCT GCGTAGCACC GGGATCATGC GTTCAAGTGC ATTTTCCCA TTGATCTCCA ACTCCACTAA AATACTTTT
 256 O
 -23
 M K K
 * inicio de stII
 1301 GAATATCGCA TTCTTCTTGG CATCTATGTT CGTTTTTCT ATTGCTACAA ACGCTACGC TGAGTTTCAG CTGGTGGAGT CTGGCGGTGG CCTGGTGCAG
 CTTATAGCGT AAGAGAGAC GTAGATACAA GCAAAAAGA TAACGATGTT TGCGCATGCG ACTCCAAGTC GACCACCTCA GACCGCCACC GGACACGTC
 -20 N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q
 * inicio de cadena pesada
 1401 CCAGGGGCT CACTCCGTTT GTCTGTGCA GCTCTGGCT TCAACATTA AGACACCTAT ATACACTGG TGCGTCAGGC CCCGGTAAG GGCCTGGAAT
 GTCCCCCGA GTGAGGCAAA CAGGACACGT CGAAGACCGA AGTTGTAATT TCTGTGGATA TATGACCC ACGCAGTCCG GGGCCCATTC CCGGACCTTA
 14 P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L E W
 *CDR-H1

FIG.-25B

1501 GGGTTGCAAG GATTATATCCT ACGAATGGTT ATACTAGATA TGCCGATAGC GTCAGGGGCC GTTCACTAT AAGCGCAGAC ACATCCAAA ACACAGCCTA
 CCCAACGTTT CTAATAGGA TGCTTACCAA TATGATCTAT ACGGTATCG CAGTCCCG CAAAGTATA TTGCGGTGTG TGTAGGTTTT TGTGTCGGAT
 48 V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y
 *CDR-H2
 1601 CCTACAAATG AACAGCTTAA GAGCTGAGGA CACTGCCGTC TATTATTGTA GCGGTGGGG AGGGAGGGC TTCTATGCTA TGGACTACTG GGGTCRAGGA
 GGATGTTTAC TTGTCGAATT CTCGACTCCT GTGACGGGAG ATAATAACAT CGGCACCCC TCCCCGCCG AAGATACGNT ACCTGATGAC CCCAGTCTCT
 81 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G
 *CDR-H3
 1701 AACTAGTCA CCGTCTCTC GGCCTCCACC AAGGGCCCAT CCGTCTTCCC CCGGCACCC TCCTCCANGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG GCCCTGGGCT
 TGTGATCAGT GGCAGAGGAG CCGGAGGTGG TTCCCGGTA GCCAGAGGG GGACCGTGG AGGAGTTCT CCGGAGACC CCGGTGTGCG CGGACCCGA
 114 T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C
 1801 GCCTGGTCAA GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGC GTGGAACCTA GCGGCCCTGA CCAGCGCGGT GCACACCTTC CCGGTGTGCC TACAGTCTC
 CGGACCACTT CCTGATGAAG GGGCTTGCC ACTGCCACAG CACCTTGAGT CCGCGGACT GGTGCGGCA CCGTGTGAAG GGGCACAGG ATGTCAGGAG
 148 L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 1901 AGGACTCTAC TCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTG GCACCCAGAC CTACATCTGC AACGTGATC ACNAGCCAG CAACACCAAG
 TCCTGAGATG AGGAGTCTG CGCACCACTG GCACGGGAGG TCGTCGAACC CGTGGTCTG GATGTAGACG TTGCACCTAG TGTTCGGGTC GTTGTGGTTC
 181 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K
 2001 GTCGACRAGA AAGTTGAGCC CAAATCTGT GACAAACTC ACCTCAGTGG CCGTGGCTCT GTTCCGCTG ATTTGATTA TGAAGATG GCAAACGCTA
 CAGCTGTCTT TTCAACTCGG GTTTAGRACA CTGTTTGG TGGAGTCACC GCCACCGAGA CCAAGGCCAC TAAACTAT ACTTTCTAC CGTTTGGGAT
 214 V D K K V E P K S C D K T H L S G G S G S G D F D Y E K M A N A N
 *fin de cadena pesada
 *inicio de proteina de cubierta de genII (267-fin)
 2101 ATAAGGGGCG TATGACCGAA AATGCCGATG AAAACGGGT ACAGCTGAC GCTAAAGGCA AACCTGATTC TGTGCTACT GATTACGGTG CTGCTATCGA
 TATTCCCGG ATACTGGCTT TTACGGGTAC TTTTGGCGA TGTGAGACTG CGATTCCGT TTGAACCTAG ACAGCGGATGA CTAATGCCAC GACGATAGCT
 248 K G A M T E N A D E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D

FIG._25C

2201 TGGTTTCATT GGTGACGTTT CCGGCTTGC TAATGGTAAT GGTGCTACTG GTGATTTTGC TGCTCTTAAT TCCCAATGG CTCAACTCGG TGACGGTGAT
 ACCAAAGTAA CCACTGCATA GCGCGGAACG ATTACCATTA CCACGATGAC CACTAAACG ACCGAGATTA AGGGTTTACC GAGTTACGCC ACTGCCACTA
 281 G F I G D V S G L A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V G D G D
 2301 AATCACCTT TAATGAATAA TTTCGGTCAA TATTACCTT CCTCCCTCA ATCGGTTGAA TGTGCGCCCTT TTGTCTTTAG CGCTGGTAAA CCATATGAAT
 TTAAGTGGAA ATTACTTATT AAGGCAGTT ATAAATGAA GGGAGGAGT TAGCCAACIT ACAGCGGGA AACAGAATC GCGACCATTT GGTATACTTA
 314 N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q S V E C R P F V F S A G K P Y E F
 2401 TTCTATTGA TTGTGACAAA ATAACTTAT TCGTGGTGT CTTTGGGTTT CTTTATATG TTGCCACCTT TATGTAATGA TTTTCTACGT TTGCTAACAT
 AAGATAACT AACHCTGTTT TATTGATA AGCACCACA GAAACGAAA GAAATATATAC AACGTGGAA ATACATACAT AAAGATGCA AACGATTGTA
 348 S I D C D K I N L F R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I
 2501 ACTGCGTAAT AAGGAGTCTT ATCATGCCA GTTCTTTTGG CTAGCGCGC CCTATACCTT GTCTGCCCTC CCGCGTTGCG TCGCGGTGCA TGGAGCGGGG
 TGACGCATTA TTCTCAGAA TTACTAGGCT CAAGAAACC GATCGCGCG GGATATGGA CAGACGGAGG GCGCAACGC AGCGCCACGT ACCTCGGCCC
 381 L R N K E S O
 2601 CCACCTCGAC CTGAATGGA GCGCGGGA CCTCGCTAAC GGATTACCA CTCAGAAT TGGAGCCAT CAATTCCTGC GGAGAACTGT GAATGCCAA
 GGTGAGCTG GACTTACCTT CCGCGCGCGT GGAGCGATTG CTTAAGTGT GAGTTCTTA ACCTCGGTTA GTTAAGAAGC CCTCTTGACA CTTACGCGTT
 2701 ACCAACCTT GGCAGAACAT ATCATCGCG TCCGCCATCT CCGCAGCGG CACGCGCGC ATCTCGGGCA GCGTTGGTCT CTGGCCACGG GTGCGCATGA
 TGGTTGGGA CCGTCTTGTA TAGCTAGCG AGCGGTAGA GGTCTGCGG GTGCGCGCG TAGAGCCCTT CGCAACCCAG GACCGGTGCC CACGCGTACT
 2801 TCGTGCTCCT GTCGTTGAG ACCCGGCTAG GTCGGCGGG TTGCCTTACT GGTAGCAGA ATGAATCAC GATACGCCAG CGAACGTGAA GCGACTGCTG
 AGCAGAGGA CAGCAACTCC TGGGCCGATC CGACCGCCATC AACGGAATGA CCAATCGTCT TACTTAGTGG CTATGCGCTC GCTTGCACTT CGCTGACGAC
 2901 CTGCAAAACG TCTGCGACCT GAGCAACAAC ATGAATGCTC TTGCGTTTCC GTGTTTCGTA AAGTCTGGA ACGGGAAGT CAGCGCCCTG CACCATTTATG
 GACGTTTTC AGACGCTGGA CTCGTTGTTG TACTTACCAG AAGCCAAAGG CACAAAGCAT TTCAGACCTT TGCGCCTTCA GTCGCGGAC GTGGTAATAC
 3001 TTCCGGATCT GCATCGCAGG ATGCTGCTGG CTACCTCTGG GAACACTAC ATCTGATTA ACGAAGCGGT GGCAATTACC CTGAGTGATT TTCTCTGGT
 AAGGCCTAGA CGTAGCGTCC TACGACGACC GATGGGACAC CTTGTGATG TAGACATAAT TGCTTCGCA CGCTAACG GACTCACTAA AAAGAGACCA

FIG._25D

3101 CCGCGCCGAT CCATACC GCC AGTTGTTTAC CCTCACAACG TTCCAGTAAC CGGCATCTT CATCATCAGT AACCCGTATC GTGAGCATCC TCCTCTCGTTT
 GGGCGGCCGA GGTATGGCGG TCAACAAATG GGAGTGTGC AAGGTCAATG GCCGTACAA GTAGTAGTCA TTGGGCATAG CACTCGTAGG AGAGAGCAAA

 3201 CATCGGTATC ATTACCOCOA TGAACAGAAA TTCCCCCTTA CACGGAGGCA TCAAGTGACC AAACAGGAAA AAACGCCCTT TAACATGGCC CGCTTTATCA
 GTAGCCATAG TAATGGGGGT ACTTGTCCTT AAGGGGAAT GTGCTCCGT AGTTCACCTG TTGTCTCTTT TTGGGGGA ATTGTACCGG GCGAATAGT

 3301 GAAGCCAGAC ATTAACGCTT CTGGAGAAC TCAACGAGCT GGACGGGAT GAACAGGAG ACATCTGTGA ATCGCTTAC GACCACGCTG ATGAGCTTTA
 CTTCCGGTCTG TAATTTGGAA GACCTCTTTG AGTTGCTCGA CCTGCGCTA CTTGCTCCGT TGTAGACT TAGCGAAGT CTGGTGGAC TACTCGAAAT

 3401 CCGCAGGATC CGGAAATTGT AAACGTTAAT ATTTGTTAA AATTCGCTT AAATTTTCT TAAATCAGCT CATTTTTTAA CCATAGGCC GAATTCGGCA
 GCGCTCCTAG GCCTTTAACA TTTCGAATTA TAAACAAAT TTAAGCGCA TTTAAACA ATTTAGTCTGA GTAAAAAT GGTATCCGG CTTTAGCCGT

 3501 AATTCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGGT GAGTGTGTT CCAGTTTGA ACAAGAGTCC ACTATTAAAG AACGTGGACT CCAACGTCAA
 TTTAGGGAAAT ATTTAGTTTT CTATCTGGC TCTATCCCA CTCACACAA GTTCAACCT TGTCTCAGG TGATAATTC TTGCACCTGA GGTTCAGTT

 3601 AGGGCGAAAA ACGTCTATC AGGGCTATGG CCCACTACGT GAACATCAC CCTAATCAG TTTTGTGGG TCGAGGTGCC GTAAAGCACT AAATCGGAAC
 TCCCGCTTTT TGGCAGATAG TCCCGATACC GGGTGATGCA CTTGGTAGTG GGATTAGTTC AAAAAACCC AGCTCCACGG CATTCGTGA TTTAGCCTTG

 3701 CCTAAAGGGA GCCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAGC CGCGAAGCT GCGGAGAGG GAAGGGAGA AAGCGAAGG AGCGGCGCT AGGGCGCTGG
 GGATTTCCCT CGGGGGCTAA ATCTCGAAT ATCTCGAAT GCGCTCTTC CCGCTCTTC CTTCCCTTCT TTCGCTTTC TCGCCCGCA TCCCGCGACC

 3801 CAAGGTAGC GGTACGCTG CGGTAACCA CCACACCGC CGGCTTAAT GCGCGCTAC AGGGCGGCTC CGGATCTGC CTGCGCGCTT TCGGTGATGA
 GTTACATCG CCAGTGGAC GCGATTGGT GGTGTGGGG GCGGAATTA CCGCGCGATG TCCCGCGAG CCTAGGACG GAGCGGCAA AGCCACTACT

 3901 CGGTGAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCC GGAGACGCTC ACAGTTGTC TGTAAAGGGA TCGCGGGAGC AGACAAGCC GTCAGGGCG GTCAGCGGGT
 GCCACTTTG GAGACTGTGT ACGTCGAGG CCTCTGCCAG TGTGACACAG ACATTCGCT ACGGCCCTCG TCTGTTCGG CAGTCCCGG CAGTCGCCCA

 4001 GTTGGCGGGT GTCGGGGCG AGCCATGACC CAGTCACCTA CGGATAGCG AGTGTACTT GGTAACTA TCGGGCATCA GAGCAGATTG TACTGAGAGT
 CACCGGCCA CAGCCCCGG TCGGTACTGG GTCAGTGCAT CGTATCGC TCACATAGA CCGAATGAT AGCCGTAGT CTCGTCTAAC ATGACTCTCA

FIG. 25E

4101 GCACCATATG CGGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG AGAAATACC GCATACGGG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGGT GCGCTCGGTC
 CGTGGTATAC GCCACACTTT ATGGCGTGT TACGCATTCC TCTTTTATGG CGTAGTCCGC GAGAAGCGA AGGAGCGAGT GACTGAGCGA CCGGAGCCAG

 4201 GTTCGGCTGC GCGGAGCGGT ATCAGCTCAC TCNAAGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGNTA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC
 CAAGCCGACG CCGCTCGCCA TAGTCGAGTG AGTTTCCGCC ATTATGCCAA TAGGTGTCTT AGTCCCTAT AGTCCCTAT TCGCTCTCTT CTTGTACTACT CGTTTCCGG

 4301 AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGCGG CGTTGTGGC GTTTTTCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA ATCGACGCT CAAGTCACAG
 TCGTTTCCG GTCTTGCCA TTTTCCGCC GCACGACCG CAAAAGGTA TCCGAGCGG GGGGACTGCT CGTAGTGTCTT TTAGCTGCA GTTCAGTCTC

 4401 GTGGCGAACC CCGACAGGAC TATAAGATA CCAGGCGTTT CCCCTGGAA GTCCCTCTGT GCGCTCTCTT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG
 CACCGCTTG GGTGTCTCTG ATATTCTAT GGTCCCAAA GGGGACCTT CGAGGGAGCA CCGCAGGGA CAAGGTGGG ACGGGAATG GCCTATGGAC

 4501 TCCGCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGC CTTTCTATA GCTCAGCTG TAGTATCTC AGTTCGGTGT AGTGGTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
 AGCGGGAAG AGGGAAGGCC TTGCGACCGC GAAAGAGTAT CGAGTGGAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC GAGGTTCGAC CCGACACACG

 4601 ACGAACCCCC CGTTACGCC GACCGTGGC CTTTATCCG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC
 TGCTTGGGG GCAAGTCGGG CTGGCGACG GANTAGGCC ATTGATAGCA GAAGTCAGT TGGGCCATT TGTGTGAAT AGCGTGACC GTGCTCGGTG

 4701 TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGTGTCT ACAGATCTT TGAAGTGGT GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC
 ACCATTGTCC TAATCGTCTC GCTCCATACA TCCGCCACGA TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CGGATTGAT CCGATGTGAT CTTCTGTCA TAAACCATAG

 4801 TGGGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAGAGTTG TAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTT GTTTGCAAGC
 ACGCGAGAG ACTTCGGTCA ATGGAAGCCT TTTTCTCAAC CATCAGAAC TAGGCCGTTT GTTTGGTGGC GACCATCGCC ACCAAAAAA CAAACGTTTC

 4901 AGCAGATTAC GCGCAGAAA AAAGGATCTC AAGAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGATTTT
 TCGTCTAATG CCGGCTCTTT TTTCTTAGG TTCTCTAGG AAATAGAAA AGATGCCCA GACTGCGAGT CACCTTGCTT TTGAGTGCAA TTCCCTAAAA

 5001 GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTAC CTAGATCCTT TTAATTAAA ATGAAGTTT TAAATCAATC TAAATATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC
 CCAGTACTCT AATAGTTTTT CCTAGAGTG GATCTAGGAA AATTAAATTT TTACTTCAAA ATTTAGTAG ATTTATATA TACTCATTTG AACCAGACTG

FIG._25F

5101 AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCT GACTCCCGT CGGTAGATA ACTACGATAC
 TCAATGGTTA CGAATTAGTC ACTCCGTGGA TAGAGTCGCT AGACAGATAA AGCAAGTAGG TATCAACGGA CTGAGGGGCA GCACATCTAT TGATGCTATG
 5201 GGGAGGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGGTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCAGATTT ATCAGCAATA AACAGCCAG CCGGAGGGG
 CCTCCCGAA TGGTAGACCG GGGTCACGAC GTTACTATGG CGCTCTGGGT GCGAGTGGCC GAGGCTPAAA TAGTCGTTAT TTGGTCGGTC GGCTTCCCG
 5301 CGAGCGCAGA AGTGTCTCTG CACTTTATC CGCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTCCG
 GCTCGGTCT TCACCAGGAC GTTGAATAG GCGGAGGTAG GTCAAGTAAT TAACACGGC CCTTCGATCT CATTCATCA GCGGTCAATT ATCAACGGC
 5401 AACGTTGTTG CCATTGCTGC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCTGTTGG TATGGCTTCA TTACAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGCCGA GTTACATGAT
 TTGCACACAC GGTACGACG TCCGTAGCAC CACAGTGGCA GCAGCAAC ATACCGAAGT AAGTCGAGGC CAAGGGTTGC TAGTTCCGCT CAATGTACTA
 5501 CCCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTCGGTGCC TCCGATCGTT GTCAGAGTA AGTTGGCCGC AGTGTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT
 GGGGTACAA CACGTTTTT CGCCAAATCGA GGAAGCCAGG AGGCTAGCAA CAGTCTTCAT TCAACCGGGC TCACAATAGT GAGTACCAAT ACCGTCGTGA
 5601 GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT AGCATGCTTT TCTGTGACTG GTGACTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAA ATGTATGCG GCGACCGAGT
 CGTATTAGA GAATGACAGT ACGGTAGGCA TTCTACGAAA AGACACTGAC CACTCATGAG TTGTTTCACT AAGACTCTTA TCACATACGC CGCTGGCTCA
 5701 TGCTCTTGGC CGGCTCAAC ACGGATRAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTAAAAGTG CTATCANTG GAAAACGTTT TTCGGGCGA AAACCTCAA
 ACGAGAACGG GCCGAGTTG TGCCCTATTA TGGCGCGGTG TATCGTCTTG AATTTTTCAC GAGTAGTAAC CTTTTCGAAG AAGCCCGCT TTTGAGAGTT
 5801 GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCCA TGTAACCCAC TCGTGACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCAAC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA
 CCTAGAATGG CGACACTCT AGGTCAAGCT ACATTGGGTG ACCACGTGGG TTGACTAGAA GTCGTAGAAA ATGAAAGTGG TCGCAAGAC CCACTCGTTT
 5901 AACAGGAAGG CAAATGCCG CAAAAAGGG AATAAGGCG ACACGGAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTATCAG
 TTGTCCTTCC GTTTTACGGC GTTTTTCCG TTATTCGCC TGTGCCCTTA CAACTATGA GTATGAGAAG GAAAAAGTTA TAATACTTC GTAAATAGTC
 6001 GGTTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCGCC AAAAGTGCCA COTGACGTCT
 CCAATACACG AGTACTCGCC TATGTATATAA CTTACATAAA TCTTTTTATT TGTATTCCG CAAGCGCGT GTAAAGGGC TTTTCACGGT GGACTGCAGA

FIG._25G

6101 AAGAACCAT TATTATCATG ACATTAACT ATAAAAATAG GGTATACG AGGCCCTTC GTCTCAATA CAGGTAGACC TTTCGTAGAG ATGTACAGTG
 TTCTTTGGTA ATAAATAGTAC TGTAAATGGA TATTTTATC CGCATAGTGC TCCGGGAAG CAGAAGTTAT GTCCATCTGG AAGCATCTC TACATGTCAC

 6201 AAATCCCCGA AATTATACAC ATGACTGAAG GAAGGGAGGT CGTCATTCCC TGCCGGGTGA CGTCACCTAA CATCACTGTT ACTTTAAAA AGTTCCACT
 TTTAGGGGT TTAATATGTG TACTGACTTC CTTCCTCGA GCAGTAAGGG ACGGCCAAT GCAGTGGATT GTAGTGACAA TGAATTTTT TCAAAAGTGA

 6301 TGACACTTTG ATCCCTGATG GAATACGGAT AATCTGGGAC AGTAGAAGG GGTTCATCAT ATCAATGCA ACGTACAAAG AATAGGGCT TCTGACCTGT
 ACTGTGAAC TAGGGACTAC CTTTTCGGTA TTAGACCCCTG TCATCTTTCC CGAAGTAGTA TAGTTACGT TGCATGTTTC TTTATCCCGA AGACTGGACA

 6401 GAAGCAACAG TCAATGGCA TTTGTATAAG ACAACTATC TCACACATCG ACAACCAAT ACAATACAGG TAGACCTTTC GTAGAGATGT ACAGTGAAT
 CTTCTGTTGC AGTTACCCGT AAACATATTC TGTGTGATAG AGTGTGATG TGTTCGGTA TGTATGTCC ATCTGGAAAG CATCTCTACA TGTCACTTA

 6501 CCCCAGAAAT ATACACATGA CTGAAGGAAG GGAGCTCGTC ATTCCCTGCC GGGTACGTC ACCTAACATC ACTGTTACTT TAAAAAGTT TCCACTTGAC
 GGGGCTTTAA TATGTGTAAT GACTTCTACT GACTTCTCTC CCTGAGCAG TAAGGGACGG CCAATGCAG TGGATTGTAG TGACAATGAA ATTTTTCAA AGGTGAACG

 6601 ACTTTGATCC CTGATGGAA ACGCATATC TGGACAGTA GAAAGGGGT CATCATATCA AATGCAAGT ACAAGAAAT AGGCTTCTG ACCTGTGAG
 TGAACATGG GACTACCTTT TGGGTATTAG ACCCTGTCTT CTTTCCCGA GTAGTATAGT TTACGTGCA TGTTCCTTTA TCCCGAAGAC TGGACACTTC

 6701 CAACACTCA TGGGCAATTTG TATAGACAA ACTATCTCAC ACATCGACAA ACCAATACAA TCTACAGTA GACCTTCTGT AGAGATGTAC AGTGAATCC
 GTTGTCAATT ACCCGTAAAC ATATCTGTT TGTAGAGTG TGTAGCTGTT TGTATGTTT AGATGTCAT CTGGAAGCA TCTCTACATG TCACCTTTAG

 6801 CCGAATTTAT ACACATGACT GAAGGAGGG AGCTGTCTAT TCCCTGCCGG GTTACGTCAC CTAACATCAC TGTACTTTA AAAAGTTTC CACTTGACAC
 GGCTTTAATA TGTGTACTGA CTTCTCTCC TCGACAGTA AGGACGGCC CAATGCAGT GATTGTAGTG ACAATGAAAT TTTTTCAAAG GTGAACCTGTG

 6901 TTTGATCCCT GATGGAAAC GCATATCTG GGACAGTAGA AAGGCTTCA TCATATCAA TGCAAGTAC AAAGAAATAG GGCTTCTGAC CTGTGAGCA
 AAAGTAGGA CTACCTTTG CGTATTAGAC CCTGTCTATCT TTCCCGAAGT AGTATAGTTT ACGTTGCATG TTTCTTTATC CCGAAGACTG GACACTTCT

 7001 ACAGTCAATG GGCATTTGTA TAAGACAAAC TATCTCACAC ATGACAAAC CAATACAATC
 TGTCACTTAC CCGTAAACAT ATTCTGTTG ATAGAGTGTG TAGCTGTTG GTTATGTTAG

FIG._25H

```

1 GAATCAACT TCTCCATCT TTTGATAAGG AATACAGAC ATGAAAATC TCATTGCTGA GTTGTATTT AGCTTGCCC AAAAAGAGA AGACTCGAAT
  CTTAAGTTGA AGAGGTATGA AACCTATTCC TTTATGCTCG TACTTTTAG AGTAACGACT CAACAATAAA TTCGAACGGG TTTTCTTCT TCTCAGCTTA

101 GAACTGTGT GCGAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT TCGCAATATG GCGAAAATG ACCAACAGCG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG
  CTTGACACAC GCGTCCATCT TCGAAACCTC TAATAGCAGT GACGTTAGGA AGCGTTATAC CGGTTTTTAC TGGTTGTCGC CAACTAACTA GTCCATCTCC

201 GGGCGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCTGTA CGACGATACG GAGCTGCTGC GCGATTACGT AAAGAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTCAGTA
  CCCGGACAT GCTCCATTTC GGGCTACGGT CGTAAGGACT GGTGCTATGC CTCGACGAGC CGTAATGCA TTTCTTCAAT AACTTCGTAG GAGCAGTCAT

301 AAAAGTTAAT CTTTTCAACA GCTGTCATAA AGTTGTCACG GCGGAGACT ATAGTCGCTT TGTTTTTTAT TTTTAATGTA TTTGTAACATA GTACGCAAGT
  TTTTCAATTA GAAAGTTGT CGACAGTATT TCAACAGTGC CGGCTCTGAA TATCAGCGGA ACAAATAA AAAATTACAT AACATTGAT CATGCGTTCA

401 TCACGTAAAA AGGTTATGTA GAGTTGAGG TGATTTTATG AAAAAGATA TCGCATTTCT TCTGCTATCT ATGTTGCTTT TTTCTATTGC TACAAATGCC
  AGTGCATTTT TCCCATACAT CTCCAACTCC ACTAAATAC TTTTCTTAT AGCTAAAGA AGAAGTAGA TACAAAGCAA AAAGATAACG ATGTTTACGG

1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A
  *Inicio de la secuencia still

501 TATGCATCCG ATATCCAGAT GACCCAGTCC CCGAGTCCC TGTCGGCTC TGTGGGGAT AGGTCACCA TCACCTGCGG TGCCAGTCAG GATGTGTCCA
  ATACGTAGGC TATAGTTCTA CTGGTCAAG GGTCTCAGG ACAGCGGAG ACACCCGCTA TCCAGTGGT AGTGGAGGC ACGTCACTC CTACACAGGT

22 Y A S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T
  *Inicio de la cadena
  ligera
  ^CDR-L1

601 CTGCTGTAGC CTGGTATCAA CAGAAACCAG GAAAGTCC GAAGTTCTG ATTACTCGG CATCTTCTCT CTACTCTGGA GTCCCTTCTC GCTTCTCTGG
  GACGACATCG GACCATAGTT GTCCTTGGTC CTTTTCGAGG CTTTGAAGAC TAAATGAGC GTAGGAAGGA GATGAGACCT CAGGGAAGAG CGAAGAGACC

56 A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G
  ^CDR-L2

701 TAGCGGTTCC GGGACGGATT TCACTCTGAC CATCAGAGT CTGCAGCGG AGACTTCGC AACTTATTAC TGTACGCAAT CTTATACTAC TCCTCCACAG
  ATGCCAAGG CCCTGCCATA AGTGAGACTG GTAGTGCTCA GACGTGCGCC TTTTGAAGG TTGAATAATG ACAGTCTGTA GAATATGATG AGGAGGTCG

89 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T
  ^CDR-L3

```

FIG. 26A

801 TTGGACAGG GTACCAAGGT GGAGATCADA CGAACTGTGG CTGCACCATC TGCTTCTATC TTCCCGCCAT CTGATCAGCA GTTGAATCT GGAAGTGCCT
AAGCTGTCC CATGGTTCCA CCHTAGTTT GCTTGACACC GACGTGGTAG ACAGAAGTAG AAGGCGGTA GACTACTGT CAACTTTAGA CCTTGACGGA
122 F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S

901 CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC
GACAACACAC GGACGACTTA TTGAAGATAG GGTCTCTCCG GTTTCATGTC ACCTTCCACC TATTGCGGA GGTAGCCCA TTGAGGTGCC TCACACAGTG
156 V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T

1001 AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGAGC TGAGCAAGC AGACTACGAG AACACAAG TCTACGCCG CGAGTCAACC
TCTCGTCTG TCGTTCTCTGT CGTGGATGTC GGAGTCTGTC TGGGACTGCG ACTCGTTTCG TCTGATGCTC TTGTGTGTTTC AGATGCGGAC GCTTCAGTGG
189 E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T

1101 CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TGGTGCCAGC TCCGGTATGG CTGATCCGAA CCGTTTCGC GGTAAAGGACC
GTAGTCCCG ACTCGAGCGG GCACTGTTTC TCGAAGTTGT CCCCTCTCAC ACCACGGTGG AGGCATACCC GACTAGGCTT GGCAAGGCG CCATTCCTGG
222 H Q G L S S P V T K S F N R G E C G A S S G M A D P N R F R G K D L
'end of light chain, start of gD tag

1201 TGGCATAACT CGAGGCTGAT CCTCTACGCC GGACGATCG TGGCCCTAGT AGCAAGTTC ACCTAAAG GGTAACTAGA GGTGAGTG ATTTATGAA
ACGTATTGA GCTCCGACTA GGAGATGCGG CCTGCGTAGC ACCGGGATCA TGGTTCAAG TGCATTTTTC CCATTGATCT CCAACTCCAC TAAATACTT
256 A O
-23

M K
*inicio de stli

1301 AAAGAATATC GCATTCTTC TTGATCTAT GTTCGTTTT TCTATTGCTA CAAACGCCA CCGTGAGGT CAGCTGGTGG AGTCTGGCGG TGGCTGTGG
TTTCTTATAG CGTAAAGAG AACGTAGATA CAAGCAAAA AGATAAGAT GTTGGCGAT GCGACTCCA GTCGACCACC TCAGACGCC ACCGAGCCAC
-21 K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G L V
'start of heavy chain

1401 CAGCCAGGG GCTACTCCG TTTGTCTGT GCAGTCTCTG GCTTCAACAT TAAAGACACC TATATACACT GGTGCGTCA GGGCCCGGT AAGGCGCTGG
GTCCGTCCC CGAGTGAGGC AAACAGGACA CGTCGAAGAC CGAGTGTGA ATTTCTGCG ATATATGTGA CCCAGCAGT CCGGGGCCCA TTCCCGGACC
13 Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L E
*CDR-H1

FIG._26B

1501 AATGGGTTGC AAGGATTAT CCTACGAATG GTTATACTAG ATATCCGAT AGCGTCAAGG GCCCTTTCAC TATACGCCA GACACATCCA AAAACACAGC
 TTACCCCAACG TTCCTAATAA GGATGCTTAC CAATATGATC TATACGGCTA TCCAGATTCC CGGCAAGTG ATATTCCGCT CTGTGTAGGT TTTTGTGTCG
 47 W V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
 *CDR-H2
 1601 CTACCTACAA ATGAACAGCT TAAGAGCTGA GGACACTGCC GTCTATTATT GTAGCCGCTG GGGAGGGGAC GGCTTCTATG CTATGGACTA CTGGGGTCAA
 GATGGATGTT TACTTGTGGA ATTCTCGACT CCTGTGACGG CAGATAATAA CATCGGGGAC CCCTCCCTCG CCGAAGATAC GATACCTGAT GACCCACGTT
 80 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q
 *CDR-H3
 1701 GGAACACTAG TCACCGTCTC CTCGGCCTCC ACCAAGGCC CATCGGTCTT CCCCTTGGA CCCTCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG
 CCTTGTGATC AGTGGCAGAG GAGCGGGAGG TGGTTCCCGG GTAGCCAGAA GGGGGACCGT GGGAGGAGGT TCTCGTGGAG ACCCCCGTGT CGCCGGGACC
 113 G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G
 1801 GCTGCTGCT/CAAGGACTAC TTCCCGGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAC TCAGGCGGCC TGACAGCGG CGTGACACCC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC
 CGACGGACCA GTTCTGTATG AAGGGCTTG GCCACTGCCA CAGCACCTTG AGTCCGGGG ACTGGTCGCC GCACGTGTGG AAGGGCCGAC AGGATGTCAG
 147 C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
 1901 CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCTGCTG GACCGTGCCC TCAGGACGCT TGGGACCCA GACCTACATC TGCACCTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC
 GAGTCTGAG ATGAGGGAGT CGTCGACCA CTGGCACGGG AGCTCGTCCA ACCCGTGGT CTGGATGTAG ACGTTGCACT TACTGTTCGG GTCGTTGTGG
 180 S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T
 2001 AAGTCTGACA AGAAAGTTGA GCCCAATCT TGTGACAAA CTCACGGCG CATGAACAG CTAGAGGACA AGGTGGAAGA GCTACTCTCC AAGAACTACC
 TTCCAGCTGT TCTTTCACT CGGGTTTGA AACTGTTT GACTGCCGCT GACTTTGTC GATCTCTGT TCCAGCTTCT CGATGAGAGG TTCTTGATGG
 213 K V D K K V E P K S C D K T H G R M K Q L E D K V E E L L S K N Y H
 *fin de cadena pesada, inicio de cremallera de leucina
 2101 ACCTAGAGAA TGAAGTGGCA AGACTCAAAA AACTTGTGCG GGAGCGCGGA AAGTTAGTG GCGGTGGCTC TGGTTCGGT GATTTGATT ATGAAAGAT
 TGGATCTCTT ACTTCACCGT TCTGAGTTT TTGAACAGCC CCTCGGCTT TTGCAATCAC CGCCACCGAG ACCAAGGCCA CTAAGAACTAA TACTTTCTA
 247 L E N E V A R L K K L V G E R G K L S G G G S G S G D F D Y E K M
 *fin de cremallera de leucinas, inicio de proteína de cubierta de gen III(267-fin)

FIG..26C

2201 GGCAAAACGCT AATAAGGGGG CTATGACCGA AATGCGCGAT GAAAACGGC TACAGTCTGA CGCTAAAGGC AAATTGTGATT CTGTGCTTAC TGATTACGGT
 CCGTTTSCGA TTATTCCCCC GATACTGGCT TTATCGGCTA CTTTGGCGG ATGTACAGACT GCGATTTCGG TTGTAACATA GACAGCGATG ACTAATGCCA
 280 A N A N K G A M T E N A D E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y G
 2301 GCTGCTATCG ATGGTTTCAT TGGTGACGTT TCCGGCCTTG CTAATGGTAA TGGTGCTACT GGTGATTTTG CTGGCTCTAA TTCCCAATNG GCTCAAGTCG
 CGACGATAGC TACCRAAGTA ACCACTGCNA AGGCGGGAAC GATTACCACT ACCACGATGA CCACATAAAC GACCGAGATT AAGGGTTTAC CGAGTTTACG
 313 A A I D G F I G D V S G L A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V G
 2401 GTGACGGTGA TAATCACCT TTAATGAATA ATTCCGCTCA ATATTACT TCCCTCCCTC AATCGGTTGA ATGTCGCCCT TTTGTCTTTA GCGCTGGTAA
 CACTGCCACT ATTAAGTGA AATTACTTAT TAAAGGCAGT TATAAATGGA AGGGAGGGAG TTAGCCAAT TACAGCGGA AACAGAAAT CCGGACCAAT
 347 D G D N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q S V E C R P F V F S A G K
 2501 ACCATATGAA TTTTCTATTG ATTGTGACAA AATAAACTTA TTCCGTGGTG TCTTTGCGTT TCTTTTATAT GTTGCCACCT TTATGTATGT ATTTTCTACG
 TGGTATACTT AAAAGATAAC TAACACTGTT TTATTGTAAT AAGCACCAAC AGAAACGCAA AGAAATATA CAACGGTGA AATACATACA TAAAGATGC
 380 P Y E F S I D C D K I N L F R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T
 2601 TTTGCTAACA TACTGCGTAA TAAGGAGTCT TAATCATGCC AGTTCTTTTG GGTAGCGCG CCCTATACCT TGTCTGCCCT CCAGCGTTGC GTGCGGGTGC
 AAACGATTGT ATGACGCATT ATTCCCTAGA ATTACTACGG TCAAGAAAC CGATCGCGG GGGATATGGA ACAGACGGAG GGGCGCAACG CAGCGCCACG
 413 F A N I L R N K E S O
 2701 ATGGAGCGCG GCCACCTCGA CCTGAATGGA AGCGCGCGG ACCTCGCTAA CGGATTACCC ACTCCAAGAA TTGGAGCCAA TCATTTCTTG CGGAGAACTG
 TACCTCGGCC CCGTGGAGCT GGACTTACCT TCGGCGCGCG TGGAGCGATT GCTTAAGTGG TGAGTTCTT AACCTCGGT AGTAAGAAC GCCTCTTGAC
 2801 TGAATGGCA AACCAACCT TGGCAGAACA TATCCATCGC GTCCGCCATC TCCAGCAGCC GCACGGGCG CATCTCGGC AGCGTTGGT CTTGGCCACG
 ACTTACGGT TTGGTTGGGA ACCGTCTGT ATAGTAGCG CAGCGGTAG AGTCTGTCG CGTGCGCGG GTAGAGCCCG TCGCAACCCA GGACCGGTGC
 2901 GGTGCGCATG ATCGTGCTCC TGTGCTTGAG GACCGGCTA GGCTGGCGG GTTGCCCTTAC TGGTTAGCAG AATGAATCAC CGATACGGA GCGAACGTGA
 CCACGCTAC TAGCACGAG ACAGCACTC CTGGGCCGAT CCGACCGGCC CACGGATG ACCAATCGTC TTACTTAGTG GCTATGCGCT CGCTTGCACT
 3001 AGCGACTGCT GCTGCAAAAC GTCTGGGACC TGAGCAACAA CATGAATGTT CTTGGTTTC CGTGTTCGT AAAGTCTGGA AACCGGGAG TCAGCGCCCT
 TCGCTGACGA CGACGTTTG CAGACGCTGG ACTCGTTGTT GTACTTACCA GAAGCCAAAG GCACAAAGCA TTTCAGACCT TTGCGCCTTC AGTCGGGGA

FIG.--26D

3101 GCACCATTTAT GTTCGGGATC TGCATCGCAG GATCCTGCTG GGTACCCCTGT GGAACACCTA CATCTGTATT AACGAAGCGC TGGCATTTGAC CCTGAGTGAT
 CGTGGTAATA CAAGGCCCTAG ACGTAGCGTC CTACGACGAC CGATGGGACA CCTTGCTGGAT GTAGACATAA TTGCTTCCGG ACCGTAACTG GGACTCACTA

 3201 TTTTCTCTGG TCCCGCGGCA TCCATACCGC CAGTGTGTTTA CCCTCACAAAC GTTCCAGTAA CCGGGCATGT TCATCATCAG TAACCCGCTAT CGTGAGCATC
 AAAAGAGACC AGGGCGGCGT AGGTATGGCG GTCAACAAT GGGAGTGTG CAAGGTCAAT GGGCGGTACA AGTAGTAGTC ATTGGGGCATA GCACTCGTAG

 3301 CTCTCTCGTT TCATCGGTAT CATTACCCCC ATGACAGAAA ATTCCCCCTT ACACGGAGC ATCAAGTGAC CAACACAGAA AAAACCGCCC TTAACATGGC
 GAGAGAGCAA AGTAGCCATA GTAATGGGG TACTGTCTT TAAGGGGAAA TGTGCTCTG TAGTCACTG GTTTGTCTT TTTTGGCGGG AATTGTACCG

 3401 CCGCTTTATC AGAAGCCAGA CATTACGCT TCTGAGAAA CTCACAGAC TGGACGGGA TGAACAGGCA GACATCTG GATCGCTCA CGACCACGCT
 GCGGAATAG TCTTCGGTCT GTAATTGCGA AGACCTCTT GAGTGTCTG ACGTGCCT ACTTGCCT CTGTAGACAC TTAGCGAAGT GCTGGTGCGA

 3501 GATGAGCTTT ACCGCAGGAT CCGGAATTG TAAAGTTAA TATTTGTTA AAATTCGCT TAAATTTTG TTAATCAGC TCATTTTAA ACCAATAGGC
 CTACTCGAAA TGGCGTCTA GGCCTTAA CATTGCAAT ATTTGCAAT ATTAACAAAT TTTAAGCGCA ATTTAAAC AATTAGTCTG AGTAAATAAT TGGTTATCCG

 3601 CGAATCGGC AAAATCCCTT ATAAATCAA AGAATAGACC GAGATAGGT TGAAGTGTG TCCAGTTTG AACAGAGTC CACTATTAA GAACGTGGAC
 GCTTTAGCCG TTTTAGGAA TATTAGTTT TCTATCTGG CTCTATCCA ACTCACAA AAGTCAACC TTGTCTCAG GTGATAATTT CTGACACCTG

 3701 TCCAACGTCA AAGGGGAAA AACCGTCTT CAGGCTATG GCCACTAG TGAACCATCA CCTAATCAA GTTTTGTGG GTCCAGGTGC CGTAAAGCAC
 AGGTTGCAGT TTCCCGCTT TTGGCAGATA GTCCCGATAC CGGGTGATG ACTTGTAGT GGGATTAGTT CAAAAAACCC CAGCTCCAG GCATTTCTGTG

 3801 TAAATCGGAA CCTAAAGG AGCCCGCT TTAGAGCTT ACGGGGAAG CCGGCGAAG TGGCGAGAA GGAAGGGAAG AAAGCGAAAG GAGCGGGCGC
 ATTTAGCCTT GGGATTCCC TCGGGGCTA AATCTGAAC TGCCCTTTC GGGCGTTGC ACCGTCTTT CCTTCCCTTC TTTCGCTTTC CTCGCCCGCG

 3901 TAGGGCGCTG GCAAGTGCTAG CGGTACGCT GCGCTAAC ACCACACCG CCGCGCTTAA TGCCTGCTA CAGGCGGCT CCGATCTG CCTCGCGCT
 ATCCCGGAC CGTTACATC GCCAGTCCGA CGGCATTGG TGGTGTGGC GGGCGGAAT ACGGCGGAT GTCCCGGCA GGCTAGGAC GGAGCGGCGA

 4001 TTCGGTGATG ACGGTGAAA CCTCTGACAC ATGACGCTC CGGAGACGCT CACAGCTTGT CTGTAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG
 AAGCCACTAC TGCCACTTT GGAGACTGT TAGTCTGAG GCTCTGCCA GTGTGGAACA GACATTGCC TACGGCCCTC GTCGTCTCG GCAGTCCCGC

 4101 CGTCAGCGGG TGTGGCGGG CAGCCATGAC CCAGTCACT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAAT ATGGGGCATC AGACAGATT
 GCAGTCGCC ACAACGCC ACAGCCCGG GTCGTACTG GGTGATGCA TCGCTATGCA CTCACATATG ACCGATTTGA TACGCCGTAG TCTCGTCTAA

FIG._26E

4201 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATCGGTAAG GAGAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTGCTC ACTGACTCGC
 CATGACTCTC ACGTGGTATA CGCCACACTT TATGGCGGT CTACGCATTC CTCCTTTATG GCGTAGTCGG CGAGAGGCGG AAGGAGCGAG TGACTGAGCG

 4301 TGCCTCGGT CGTTGCGGTG CGGCGAGCGG TATCAGTCTA CTCGAAGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG
 ACGGAGGCCA GCAAGCCGAC GCGCTCGCC ATAGTCGAGT GAGTTCCGC CATTATGCCA ATAGGTGCT TAGTCCCTA TTGCGTCTT TCTTGATAC

 4401 AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC GGGTGTGTG CGTTTTTCCA TAGCTCCGC CCCCTGACG ACCATCACAA AAATCGACGC
 TCGTTTTCCG GTCGTTTTCC GGTCTTGGC ATTTTCCGG CGCAACACC GCAAAAGGT ATCCGAGGCG GGGGACTGC TCGTAGTGT TTTAGCTGCG

 4501 TCAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAGAT ACCAGGGTT TCCCTCTGGA AGTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA
 AGTTCAGTCT CCACGGCTTT GGGCTGTCT GATATTTCTA TGGTCCGAA AGGGGACCT TCGAGGGAGC ACGGAGGCG ACAAGGCTGG GACGGCGAAT

 4601 CCGGATACCT GTCCGCCCTT CTCCTTCCG GAGCGGTGG GAGGCTCAT AGCTCAGCT GTAGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTT CTTCCAGCT
 GGCCTATGGA CAGCGGAAA GAGGGAAGC CTTCGCACCG CGAAAGATA TCGAGTGGG CATCCATAGA GTCAAGCCAC ATCCAGCAAG CGAGGTTCTGA

 4701 GGGCTGTGT CACGAACCC CGCTTCAGC CGACCGGTGC GCTTATCCG GTACTATCG TCTTGAGTCC NACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 CCCGACACAC GTGCTTGGG GGCAGTCCG GCTGGGACG CGGAATAGC CATTGATAGC AGAATCAGG TTGGGGCCATT CTGTGCTGAA TAGCGGTGAC

 4801 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTG TACAGAGTTC TTGAGTGGT GGCCTAATA CGGCTACACT AGAAGGACAG
 CGTCGTCGGT GACCATGTC CTATCGTCT CGTCCATAC ATCCGCCACG ATGTCTCAAG AACTTCACCA CCGGATTGAT GCCGATGTA TCTTCTCTGTC

 4901 TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACTTTCG AAAAGAGTT GGTAGTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT
 ATAAACCATA GACGGGAGAC GACTTCGGTC ATGGGAAGCC TTTTCTCAA CCATCGAGAA CTAGGCCGTT TGTTTGGTGG CGACCATCGC CACCAAAAAA

 5001 TGTITGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAGCGA AAACCTCAGT
 ACAACGTTT GTCGCTTAAT GCGGCTCTTT TTTTCTTCTA GTTCTTCTAG GAACTAGAA AAGATGCCCC AGACTGCGAG TCACCTTGCT TTTGAGTGCA

 5101 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAATTA AAATGAAGTT TTAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA
 ATTCCTAAA ACCAGTACTC TAATAGTTTT TCCTAGAAGT GATCTAGGA AAATTAAT TTTACTTCAA MATTAGTATA GATTCTAT ATACTCATTT

 5201 CTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCCACC TATCTAGCG ATCTGCTAT TTGCTTCTAT CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT
 GAACCAACT GTCAATGGTT ACGAATTAGT CACTCCGTGG ATAGATCGC TAGACAGATA AAGCAAGTAG GTATCAACGG ACTGAGGGGC AGCACATCTA

FIG._26F

5301 AACTACGATA CGGAGGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGGT GCAATGATAC CGGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAAGCCA
 TTGATGCTAT GCCCTCCCGA ATGCTAGAAC GGGGTCAAGC CGTACTATG GCGCTCTGGG TCGAGTGGC CGAGGTCTAA ATAGTCGTTA TTTGGTCGGT

 5401 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCTT GCACTTTAT CCGCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA
 CGGCCTTCCC GGCTCCCGTC TTCACCAGGA CGTTGAAATA GCGGGAGGTA GGTCAATNA TTAACAACGG CCCTTCGATC TCATTTCATCA AGCGGTCAAT

 5501 ATAGTTTGGC CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCCT GGTGTCAGC TCGTCTTTG GTATGGCTTC ATTTCAGTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG
 TATCAAAACG GTTGCAACAA CGGTAACGAC GTCCGTAGCA CCACAGTGG AGCAGCAAC CATACCGAAG TAACTCGAGG CCAAGGGTTG CTAGTTCCGC

 5601 AGTTACATGA TCCCCTCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC TCCTTGGTC CTCGATCGT TGTCAAGAGT AAGTTGGCG CAGTGTATC ACTCATGGTT
 TCAATGTACT AGGGGGTACA ACACGTTTTT TCGCCAATCG AGGAAGCCAG GAGGTAGCA ACAGTCTTCA TTCAACCGGC GTCAATATAG TGAGTACCAA

 5701 ATGGCAGCAC TGCATTAATTC TCTTACTGTC ATGGCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC
 TACCGTCGTG ACGTATTAAG AGAATGACAG TACGGTAGGC ATTCTACGAA AAGACACTGA CCACTCATGA GTTGGTTTCAG TAAGACTCTT ATCACATAGG

 5801 GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGGGTCAA CACGGGATAA TACCGGGCA CATAGAGAA CTTTAAAGT GCTCATCATT GGAACACGTT CTTCGGGGGG
 CCGCTGGCTC AACGAGAAG GCGCGAGTT GTGCCCTATT ATGGCGCGGT GTATCGTCTT GAAATTTTCA CGAGTAGTAA CCTTTTGCAA GAAGCCCCGC

 5901 AAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTGG ATCTAACCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT
 TTTTGAGAGT TCCTAGAATG GCGACAATC TAGTCAAGC TACATTGGGT GAGCACGTGG GTTGACTAGA AGTGAAGTG GTGCAAGA

 6001 GGGTGAGCAA AACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAGG GAATAAGGC GACACGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATATTGAA
 CCCACTCGTT TTTGTCCTTC CGTTTACGG CGTTTTCCTT CTTATTCCCG CTGTGCTTTT ACACTTATG AGTATGAGAA GGAATAAGTT ATATTAATTT

 6101 GCATTTATCA GGGTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAATA AACAAATAGG GGTCCCGCG ACATTTCCC GAAAGTCCC
 CGTAAATAGT CCCAATAACA GAGTACTCGC CTATGTATAA ACTTACATAA ATCTTTTAT TTGTTTATCC CCAAGGCGGG TGTAAGGGG CTTTTTCACGG

 6201 ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAATA GCGGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAAT ACAGGTAGAC CTTTCGTAGA
 TGGACTGCAG ATTCTTTGGT AATAATAGTA CTGTAATTGG ATATTTTAT CGCATAGTG CTCCGGGAAA GCAGAAGTTA TGTCATCTG GAAAGCATCT

 6301 GATGTACAGT GAAATCCCCG AAATTATACA CATGACTGAA GGAAGGGAGC TGGTCAATCC CTGCGGGT ACCTCACCTA ACATCACTGT TACTTTAAAA
 CTACATGTCA CTTTAGGGC TTTAATATGT GTACTGACTT CCTTCCCTCG AGCAGTAAGG GACGCCCCAA TGCAGTGGAT TGTAGTGACA ATGAAATTTT

FIG._26G

6401 AAGTTTCCAC TTGACACTTT GATCCCTGAT GGAAGACGCA TAATCTGGGA CACTAGAAAG GGCTTCATCA TATCAAAATGC AACGTACAAA GAAATAGGGC
 TTCAAAGGTG AACTGTGAAA CTAGGGACTA CCTTTTGGGT ATTAGACCGT GTCATCTTTC CCGAAGTAGT ATAGTTTACG TTGCATGTTT CTTTATCCCG

 6501 TTCTGACCTG TGAAGCAACA GTCAATGGGC ATTGTATAA GACAAACTAT CTCACACATC GACAAACCAA TACAATACAG GTAGACCTTT CGTAGAGATG
 AAGACTGGAC ACTTCGTTGT CAGTTACCG TAAACATATT CTCTTTGATA GAGTGTGAG CTCTTTGGTT ATGTTATGTC CATCTGGAAA GCATCTCTAC

 6601 TACAGTGAAA TCCCCGAAAT TATACACATG ACTGAAGGAA GGGAGCTCCT CATCCCTGC CGGGTTACGT CACCTAACAT CACTGTTACT TTAAAAAGT
 ATGTCACCTT AGGGGCTTAA ATATGTGTAC TGACTTCCTT CCCTCGAGCA GTAAGGGACG GCCCAATGCA GTGCAATGTA GTGACAATGA AATTTTTC

 6701 TTCCACTTGA CACTTTGATC CTGATGGAA AACCATATAT CTGGACAGT AGAAGGGCT TCATCATATC AAATGCAACG TACAAAGAAA TAGGGCTTCT
 AAGGTGAAC CTGAACCTAG GGACTACCTT TTGGGTATTA GACCTGTCA TCTTCCCGA AGTAGTATAG TTTACGTTGC ATGTTTCTTT ATCCCGAAGA

 6801 GACCTGTGAA GCACAGTCA ATGGGCATT GTATAAGACA AACATCTCA CACATCGACA AACCAATACA ATCTACAGGT AGACCTTTCG TAGAGATGTA
 CTGGACACTT CGTTGTCAGT TACCCGTAAA CATATTCTGT TTGATAGAGT GTGTAGCTGT TTGGTTATGT TAGATGTCCA TCTGGAAAGC ATCTCTACAT

 6901 CAGTGAATC CCCGAATTA TACACATGAC TGAAGGAAG GAGTCGTCA TTCCCTGCCG GGTACGTCA CCTAACATCA CTGTTACTTT AAAAAAGTTT
 GTCACCTTAG GGGCTTTAAT ATGTGTACTG ACTTCCTTCC CTCGAGCAGT AAGGGACGGC CCAATGCAGT GGATGTAGT GACAATGAAA TTTTTCAAA

 7001 CCACCTGACA CTTTGATCCC TGATGGAAA CGCATATCT GGGACAGTAG AAAGGGCTTC ATCATATCAA ATGCAACGTA CAAAGAAATA GGGCTTCTGA
 GGTGAACCTGT GAAACTAGG ACTACCTTTT GCGTATTAGA CCTGTCTATC TTCCCGAAG TAGTATAGTT TACGTTGCAT GTTCTTTTAT CCCGAAGACT

 7101 CCTGTGAAGC AACAGTCAAT GGGCATTTGT ATAGACAAA CTATCTCACA CATCGACAAA CCAATACAAT C
 GGACACTTCG TTGTCAGTTA CCGTAACA TATCTGTTT GATAGAGTGT GTAGCTGTTT GGTATGTGA G

FIG._26H

1 ATGAAAAGA ATATCGCAT TCTTCTTGCA TCTATGTTG TTTTCTTAT TGCTACAAAT GCCTATGCAG ATATCCAGAT GACCCAGTCC CCGAGCTCCC
 TACTTTTCT TATAGCGTAA AGAAGACAGT AGATCAAGC AAAAAGATA AGATGTTTA CGGATACGTC TATAGTCTTA CTGGGTGAGG GGCTCGAGGG
 1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A D I Q M T Q S P S S L
 *met
 *inicio de la secuencia señal still
 *inicio de la cadena ligera
 101 TGTCCGCCCTC TGTGGGGGAT AGGGTCACCA TCACCTGCGG TGCCAGTCAG GATGTGTCCA CTGCTGTAGC CTGGTATCAA CAGAAACAGG GAAAAGCTCC
 ACAGGGGAG ACACCCGGTA TCCAGTGGT AGTGGAGGC ACGGTACGTC CTACACAGGT GACACATCG GACCATAGTT GTCTTTGTC CTTTTCGAGG
 35 S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P
 *CDR-L1
 201 GAAGCTTCTG ATTTACTCGG CATCCTTCTT CTACTCTGGA GTCCCTTCTC GTTCTCTGG TAGCGGTTCC GGGACGGATT TCACTCTGAC CATCAGCAGT
 CTTGGAAGAC TAAATGAGCC GTAGGAAGGA GATGAGACCT CAGGGAAGAG CGAAGAGACC ATGCCAAGG CCCTGCCTAA AGTGAGACTG GTACTCGTCA
 68 K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S
 *CDR-L2
 301 CTGCAGCCGG AAGACTTCGC AACTATTAC TGTACGAAC ATTATACTAC TCCTCCACG TTCCGACAGG GTACCAAGGT GGAGATCAA CGAAGTGTGG
 GACGTGGGCC TTCTGAAGCG TTGTAATATG ACAGTGTGTT TAATATGATG AGAGGGTTC AAGCTGTCC CATGGTTCCA CCTCTAGTTT GCTTGACACC
 101 L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A
 *CDR-L3
 401 CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAATCT GGAATGCTT GGTGTGTG CCGTGTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC
 GACGTGGTAG ACAGAAGTAG AAGGCGGTA GACTACTCGT CAACCTTTAGA CTTGACGGA GACAACACAC GGACACTTA TTGAAGATAG GGTCTCTCCG
 135 A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A
 501 CAAGTACAG TGGAGGTGG ATACGCCCT CCATCCGGT AACTCCAGG AGAGTGTAC AGACAGGAC AGCAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC
 GTTTCATGTC ACCTTCCACC TATTGCGGGA GGTACGCCA TTGAGGTCC TTCACAGTG TCTGTCCTG TCGTTCTGT GGTGGATGC GGTGCTGTCG
 168 K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S
 601 ACCCTGACGC TGAGCAAGC AGACTACGAG AAACACAAG TCTACGCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGTCTGCC CGTCACAAG AGCTTCAACA
 TGGACTGCG ACTCGTTTCG TCTGATGCTC TTTGTGTTT AGATGGGAC GTTTCAGTGG GTACTCCCG ACTCGAGCGG GCAGTGTTC TCGAAGTTGT
 201 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R

FIG.-27A

701 GGGGAGAGTG TGGTGCCAGC TCCGGTATGG CTGATCCGAA CCGTTTCGGC GGTAAAGACC TGGCATAACT CGAGGGTCAT CCTCTACGCC GGACGCATCG
 CCCCTCTCAC ACCACGGTGG AGGCATATACC GACTAGGCTT GGCRAAGGCG CCATTCTGG ACCGTATTGA GCTCCGACTA GGAGATGCGG CCTCGGTAGC
 235 G E C G A S S G M A D P N R F R G K D L A O
 *fin de cadena ligera , inicio de etiqueta de gD

 801 TGGCCCTAGT ACCCAAGTTC ACSTAAAAAG GGTAACTAGA GGTGAGGTG ATTTTATGAA AAAGAATATC GCATTTCTTC TTGCATCTAT GTTCGTTTTT
 ACCGGGATCA TCGGTTCAAG TGCATTTTTC CCATTGATCT CCACTCCAC TAAATACTT TTCTTTATAG CTTAAAGAG AACGTAGATA CAAGCAAAA
 -23 M K K N I A F L L A S M F V F
 *inicio de stII

 901 TCTATTGCTA CAAACGGTA CGCTGAGGT CAGCTGGTGG AGCTGGCGG TGGCTGGTG GGTCACTCG TTGTCTCTGT GCAGCTCTG
 AGATACGAT GTTGGCGAT GCGACTCCAA GTCGACCACC TCAGACGCC GTCGGTCCCC CGAGTGAGGC AAACAGGACA CGTCGAAGAC
 -8 S I A T N A Y A E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G
 *inicio de cadena pesada
 *CDR-H1

 1001 GCTTCACCAT TAGTGGTTCT TGGATACACT GGGTGGGTCA GGGCCCGGTG AAGGCTGTG ATGGGTGC TTGGATTGCT CTTATAGCG GCGTACTGA
 CGAAGTGTA ATCACCAGA ACCTATGTGA CCCACCGAGT CCGGGGCCA TTCCCGGACC TTACCCACG AACCTAAGA GGAATATCGC CGCGATGACT
 27 F T I S G S W I H W V R Q A P G K G L E W V A W I A P Y S G A T D
 *CDR-H2

 1101 CTATGCCGAT AGGTCRAGG GCGGTTTCAC TATAAGCGCA GACACATCCA AAACACAGC CTACCTACAA ATGAACAGT TAAGAGCTGA GGACACTGCC
 GATACGGCTA TCGCAGTTCC CGGCAAAAGT ATATTGCGT CTGTGCGGT TTTGTGTCG GATGGATGT TACTTGTCGA ATTCTCGACT CCTGTACCGG
 60 Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A

 1201 GTCTATTATT GTCAAGAGA GGGGGGCTTG TACTGGGTGT TCGACTACTG GGTCAAGGA ACACTACTCA CCGTCTCTC GGCCTCCACC AAGGGCCCAT
 CAGATAATAA CACGTTCTCT CCCCCCGAAC ATGACCCACA AGCTGATGAC CCCAGTCTCT TGTGATCAGT GGCAGAGGAG CCGGAGGTGG TTCCCGGGTA
 93 V Y Y C A R E G G L Y W V F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S
 *CDR-H3

 1301 CGGTCTTCCC CCTGGCACC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGCTGTC
 GCCAGAAGG GGACCGTGG AGGAGTTCT CGTGAGAGC CCGCTGTCG CCGGACCGA CGGACCACTT CTGATGAAG GGGCTTGGCC ACTGCCACAG
 127 V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S

FIG.-27B

1401 GTGGAACCTCA GCGGCCCTGA CCACGGGGCT GCACACCTTC CCGGCTCTCC TACAGTCTTC AGGACTCTAC TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC
 CACCTTGAGT CCGCGGGACT GGTGCGCGCA CGTGTGGAG GCGCGACAGG ATGTGAGATG AGGAGTCTGT CGCACCACTG GCACGGGAGG
 160 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S
 1501 AGCAGTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC AACGTGAATC ACAAGCCAG CHACACCAAG GTGACACAAGA AAGTTGAGCC CAAATCTTGT GACAAAACCTC
 TCGTCGAACC CGTGGGTCTG GATGTAGACG TTGCACTTAG TGTTGGGTC GTTGTGGTTC CAGTGTCTT TCAACTCGG GTTTAGRACA CTGTTTGAG
 193 S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H
 1601 ACCTCAGTGG CCGTGGCTCT GGTTCGGTG ATTTTGATTA TGAAGAATG GCAACGGCTA ATAGGGGGC TATGACCGAA AATGCCGATG AAACGGGCT
 TGGAGTCACC GCCACCGAGA CCAAGGCCAC TAAACTAAT ACTTTCTTAC CGTTGCGAT TATCCCCCG ATACTGGCTT TTACGGGTAC TTTTGGCGGA
 227 L S G G S G S G D F D Y E K M A N A N K G A M T E N A D E N A L
 *fin de cadena pesada
 *inicio de la proteina de cubierta de (267-fin)
 gen III
 1701 ACAGTCTGAC GCTAAAGGCA AACTTGATTC TGTCGGTACT GATTACGGTG CTGCTATCGA TGGTTTCATT GGTGACGTTT CCGGCCCTGC TAATGGTAAT
 TGTCAGACTG CGATTTCCGT TTGAACCTAG ACAGCGATGA CTAATGCCAC GACGATAGT ACCAAGTAA CCACCTGCAA GCGCGGAACG ATTACCATTA
 260 Q S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G D V S G L A N G N
 1801 GGTGCTACTG GTGATTTTGC TGGCTCTAAT TCCCAAATGG CTCAGTGG TGACGGTGAT AATTCACCTT TAATGAATAA TTTCCGTCAA TATTTACCTT
 CCACGATGAC CACTAAAACG ACCGAGATTA AGGGTTTACC GAGTTCAGCC ACTGCCACTA TTAAGTGGAA ATTACTTATT AAAGGCAGTT ATAAATGGAA
 293 G A T G D F A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R Q Y L P S
 1901 CCTCCCTCA ATCGGTTGAA TGTCGGCCCT TTGCTTTAG CGTGGTAA CCATATGAAT TTTCTATTGA TTGTGACAA ATAACTTAT TCCGTGGTGT
 GGGAGGGAGT TAGCCCACTT ACAGCGGGA AACAGAAATC GCGACCATTT GGTATACTTA AAAGATAACT AACACTGTTT TATTTGAATA AGGCACCACA
 327 L P Q S V E C R P F V F S A G K P Y E F S I D C D K I N L F R G V
 2001 CTTTGCCTTT CTTTATATG TTGCCACCTT TATGATGTA TTTTCTACGT TTGCTAATCAT ACTGCTAAT ANGGAGTCTT AA
 GAAACGCAA GAAATATAC AACGGTGGAA ATACATACAT AAAAGATGCA AACGATTGTA TGACGCATTA TTCCTCAGAA TT
 360 F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L R N K E S O

FIG..27C

1 ATGAAAAGA ATATCGGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTG TTTTCTTCTAT TGCTACAAT GCTATGCAG ATATCCAGAT GACCCAGTCC CCGAGCTCCC
 TACTTTTCT TATAGCGTAA AGAAGAACGT AGATAAAGC AAAAAGATA ACGATGTTA CGGATACGTC TATAGGTCTA CTGGTCAGG GGCTCGAGGG
 1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A D I Q M T Q S P S S L
 *met
 *inicio de la cadena ligera
 101 TGTCCGCCTC TGTGGGGAT AGGTCACCA TCACCTGCCG TGCCAGTCAG GATGTGCCA CTGCTGTAGC CTGTATCAA CAGAAACCAG GAAAAGTCC
 ACAGGGGAG ACACCCGCTA TCCAGTGGT AGTGGAGGC ACGTCTAGTC CTACACAGGT GAGACATCG GACCATAGTT GTCTTGGTC CTTTTCGAGG
 35 S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P
 *CDR-L1
 201 GAAGCTTCTG ATTACTCGG CATCCTTCT CTACTCGGA GTCCCTTCTC GTTCTCTGG TAGCGTTC TAGCGGATT TCACCTGAC CATCAGCAGT
 CTTGAGAGAC TAAATGAGCC GTAGGAAGGA GATGAGACCT CAGGGAAGAG CGAAGAGACC ATCGCCAGG CCTGSCCTAA AGTGAGACTG GTAGTCGTCA
 68 K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S
 *CDR-L2
 301 CTGCAGCCG AGACTTCGC AACTTATTAC TGTACGAAC ATTATATAC TCCTCCACG TTGCGACAGG GTACCAAGGT GGAGATCAA CGAACTGCGG
 GACGTGCGCC TTCTGAAGG TTGAATANTG ACAGTCTGTG TAATATGATG AGAGGGTGC AAGCCTGTCC CATGGTTCCA CCTCTAGTTT GCTTGACACC
 101 L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A
 *CDR-L3
 401 CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAATCT GGAATGCTT GGTCTGTG CTGTCTGAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC
 GACGTGGTAG ACAGAAGTAG AAGGCGGTA GACTACTCGT CAACTTTAGA CTTGACGGA GACAACACAC GGACGACTTA TTGAAGATAG GGTCTCTCCG
 135 A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A
 501 CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATACGCCCT CCAATCGGT AACTCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC
 GTTTCATGTC ACCTTCCACC TATTGCGGGA GGTTAGCCA TTGAGGTCC TCTCACAGTG TCTGTCCTG TCGTTCCTGT CGTGGATGTC GGAGTCGTCG
 168 K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S
 601 ACCCTGACGC TGAGCAAGC AGACTACGAG AAACAAG TCTACGCTG CBAAGTACC CATCAGGACC TGAGCTCGCC CGTCACAAG AGCTTCAACA
 TGGGACTGCG ACTCGTTTCG TCTGATGCTC TTTGTGTTTC AGATGCGGAC GTTTCAGTGG GTAGTCCCGG ACTCGAGCGG GCAGTGTTC TCGAAGTTGT
 201 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R

FIG._28A

701 GGGGAGAGTG TGGTGCCAGC TCCGGTATGG CTGATCCGAA CCGTTTCCGC GGTAAAGGACC TGGCATNACT CGAGGTGAT CCTCTACGCC GGACGCATCG
 CCCCCTCTCAC ACCACGGTCG AGGCATACCC GACTAGCCTT GGCAAGCGG CCATTCCTCG ACCGTATTGA GCTCCGACTA GGAGATGCGG CCTGCGGTAGC
 235 G E C G A S S G M A D P N R F R G K D L A O
 *fin de cadena ligera , inicio de la etiqueta de gD
 801 TGGCCCTAGT ACGCAAGTTC ACGTAAAG GGTAACTAGA GGTGAGGTG ATTTATGAA AAGAATATC GCATTTCTTC TTGCATCTAT GTTCGTTTTT
 ACCGGGATCA TGGGTTCAAG TGCATTTTTC CCATTGATCT CCAACTCCAC TAAATACCTT TTCTTTATAG CGTAAAGAAG AACGTAGATA CAAGCAAAAA
 -23 M K K N I A F L L A S M F V F
 *inicio de still
 901 TCTATTGCTA CAAACGGCTA CGCTGAGGT CAGCTGGTGG AGTCTGGCGG TGGCTGGTG CAGCCAGGGG GCTCACTCCG TTTGTCTCTGT GCAGCTTCTG
 AGATAACGAT GTTGGCGCAT GCGACTCCAA GTCGACCACC TCAGACCGCC ACCGGACCCG GTCGGTCCCC CGAGTGAGGC AAACAGGACA CGTCGAAGAC
 -8 S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G
 *inicio de cadena pesada
 1001 GCTTCACCAT TAGTAATTAT GGGATACACT GGGTGCGTCA GGGCCCGGT AAGGCCCTGG AATGGGTGG TAGGATTCT CTTCTTAAGC GCTCTACTTA
 CGAAGTGGTA ATCATTAAATA CCCTATGTGA CCCACGCAGT CCGGGGCCCA TTCCCGGACC TTACCCAAACC ATCCTAAAGA GGAAGATTGC CGAGATGAAT
 27 F T I S N Y G I H W V R Q A P G K G L E W V G R I S P S N G S T Y
 *CDR-H2
 1101 CTATGCCGAT AGCGTCAAGG GCGGTTTCAC TATAGCGCA GACACATCCA AAAACACAGC CTACCTACAA ATGAACAGCT TAAGAGCTGA GGACACTGCC
 GATACGGCTA TCGCAGTTCC CGGCAAGTG ATATTCGGGT CTGTGTAGGT TTTTGTGTCG GATGATGTT TACTTGTCGA ATTCTCGACT CCTGTGACGG
 60 Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A
 1201 GTCTATTATT GTGCAAAATG CTCGGTCAGG TTGCTTACT GGGGTCAAGG AACACTAGTC ACCGTCTCCT CGGCCTCCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC
 CAGATAATAA CACGTTTTAC GAGCCAGTCC AAGCGAATGA CCCAGTTCC TTGTGATCAG TGGCAGAGGA GCCGGAGGTG GTTCCCGGGT AGCCAGAAGG
 93 V Y Y C A K C S V R F A Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P
 *CDR-H3

FIG._28B

1301 CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAG GGCCTTGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCGCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAACTC
 GGGACCGTGG GAGGAGGTTC TCGTGGAGAC CCGCGTGTG CCGGGACCG ACGGACCACT TCCTGATGAA GGGCTTGGC CACTGCCACA GCACCTTGAG
 127 L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S
 1401 AGGCGCCTG ACAGCGGGG TGCACACCTT CCGGGCTGT CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG
 TCCGCGGGAC TCGTCGCCGC ACCTGTGGAA GGGCCGACAG GATCTCAGG ATCTCTAGAT GAGGAGTGC TCGCACCACT GGCACGGGAG GTCTCGAAC
 160 G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L
 1501 GGCACCCAGA CTTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGACAAAG AAAGTTGAGC CCAATCTTG TGACAAAAC CACCTCAGTG
 CCGTGGGTCT GGATGTAGAC GTTGCACTTA GTCTTGGGT CGTTGTGGT CCAGCTGTTT CCACTGAGC GGTTAGAAC ACTGTTTTGA GTGAGTCA
 193 G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H L S G
 *fin de cadena pesada
 inicio de la proteína de cubierta de gen III (267-fin)
 1601 GCGGTGGCTC TGGTCCGGT GATTTTGATT ATGAAAAGAT GCAAAAGCT AATAAGGGG CTATGACCGA AATGCGCAT GAAACGGCG TACAGTCTGA
 CGCCACCGAG ACCAAGGCCA CTAAAGCTAA TACTTTCTA CGTTTGGGA TTATCCCC GATAGTGGT TTTACGGCTA CTTTGGCGG ATGTCAGACT
 227 G G S G S G D F D Y E K M A N A N K G A M T E N A D E N A L Q S D
 1701 CGCTAAAGC AACTTGATT CTGTCGCTAC TGATTACGGT GGTCTATCG ATGTTTTCAT TGGTGACGTT TCCGGCCCTG CTAATGGTAA TGGTGTCTACT
 GCGATTTCCG TTGCAACTAA GACAGCGATG ACTAATGCCA CGACGATAGC TACCAAGTA ACCACTGCAA AGCGCGGAAC GATTACCATT ACCACGATGA
 260 A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G D V S G L A N G N G A T
 1801 GGTGATTTG CTGGCTCTAA TTCCCAATG GCTCAGTGC GTGACGGTGA TAATTCACCT TTAATGAATA ATTCCGTCA ATATTACCT TCCCTCCCCTC
 CCACTAAAC GACCGAGATT AAGGTTTAC CGACTTCAGC CACTGCCACT ATTAAGTGA AATTACTTAT TAAAGCAGT TATAATGGA AGGAGGGAG
 293 G D F A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q
 1901 AATCGGTGA ATGTCGCCCT TTGTCTTTA GCGCTGGTAA ACCATATGAA TTTTCTATTG ATTGACAA AATAACTTA TTCCGTGGTG TCTTGGCTT
 TTAGCCAACT TACAGCGGGA AACAGAAAT CCGCACCAT TGGTATACTT AAAGATPAAC TAACACTGTT TTATTGAAAT AAGCACCCAC AGAAACGCAA
 327 S V E C R P F V F S A G K P Y E F S I D C D K I N L F R G V F A F
 2001 TCTTTTATAT GTTCCACCT TTAATGATGT ATTTTCTAGG TTGCTAACA TACTGCTAA TAAGGAGTCT TAA
 AGAAATATA CAAGGTGGA AATACATACA TAAAGATGC AAAGATTGT ATGACGCAAT ATTCTTCAGA ATT
 360 L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L R N K E S O

FIG.-28C

1 ATGAAAAAGA ATATCGGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTG TTTTCTTAT TGCTACAAAT GCCTATGCAT CCGATATCCA GATGACCCAG TCCCCGAGCT
 TACTTTTCT TATAGCGTAA AGAAGAAGT AGATACAAGC AAAAAGATA AGCATGTTTA CCGATACGTA GGCTATAGGT CTACTGGGTC AGGGGCTCGA
 1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A S D I Q M T Q S P S S
 *met
 * inicio de la secuencia señal still
 * inicio cadena ligera
 101 CCCTGTCCG CTCTGTGGG GATAGGGTCA CCATCACCTG CCGTGCCAGT CAGGATGCT CCACTGCTGT AGCTTGGTAT CAACAGAAAC CAGGAAAGC
 GGGACAGGG GAGACACCG CTATCCAGT GGTAGTGGAC GGCACGGTCA GTCTACACA GGTGACGACA TCGACCATTA GTTGCTTTG GTCCTTTTCG
 35 L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A
 *CDR-L1
 201 TCCGAGGCT CTGATTACT CGGCATCCTT CCTTACTCT GGAGTCCCTT CTGCTTCTC TGGTAGCGGT TCCGGGACGG ATTTCACTCT GACCATCAGC
 AGGCTTCGAA GACTAAATGA GCCGTAGGAA CCTCAGGGA GAGCGAAGAG ACCATCGCCA AGGCCCTGCC TAAAGTGAGA CTGGTAGTGG
 68 P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S
 *CDR-L2
 301 AGTCTGCAG CGGAGACTT CGCAACTTAT TACTGTGAG TACTCTCC ACTTCTTAC TCTGGAAGT CCGTTCGGAC AGGTACCAA GGTGAGATC AAACGAAGT
 TCAGACGTC GCCTTCTGAA GCGTTGAATA ATGACAGTCG TTAGAATATG ATCAGGAGGG TCGAAGCCCTG TCCCATGGT CCACCTCTAG TTGCTTGAC
 101 S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V
 *CDR-L3
 401 TGGTGCACC ATCTGCTTC ATCTTCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAA TCTGGAACTG CCTCTGTTGT GTGCTGCTG AATNACTTCT ATCCCAGAGA
 ACCGACGTGG TAGACAGAG TAGNAGGCG GTAGACTACT CGTCAACTTT AGACCTTGAC GAGACACA CACGACGAC TTATTGAAGA TAGGGTCTCT
 135 A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E
 501 GGCCAAAGTA CAGTGGAGG TGGNTACGC COTCCAATCG GGTAACTCC AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
 CCGGTTTCAT GTCACCTTC ACCTATGCG GAGGTTAGC CCATTGAGG TCCTCTACA GTGCTCGTC CTGCTGTTCC TGTCGTGGAT GTCGGAGTCG
 168 A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S
 601 AGCACCCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AACTCTAGC CTGCGAAGTC ACCATCAGG GCCTGAGTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
 TCGTGGGACT GCGACTCGTT TCGTCTGATG CTCTTTGCTG TTCAGATCGG GAGCCTTACG TGGGTAGTCC CCGACTCGAG CGGGAGTGT TTCTCGAAGT
 201 S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N

FIG.-29A

701 ACAGGGGAGA GTGTGGTGCC AGTCCGGTA TGGTGATCC GAACGTTTC CGCGGPAAGG ACCTGGCATA ACTCGAGGCT GATCCTCTAC GCCGGACGCA
 TGTCCTCTT CACACCACGG TCAGAGGCCAT ACCGACTAGG CTTGGCAAG GCGCCATTCC TGGACCGTAT TAGCTCCGA CTAGGAGATG CGGCTGCGT
 235 R G E C G A S S G M A D P N R F R G K D L A O
 *fin de cadena ligera , inicio de la etiqueta gD

 801 TCCTGGCCCT AGTACGCAAG TTCACGTAA AAGGTAACT AGAGTTGAG GTGATTTTAT GAAAAGAAT ATCGCATTC TTCTTGATC TATGTTCTGTT
 AGCACCGGA TCATGGGTTT AAGTGCAATT TTCCCATTTA TCTCCAACTC CACTAAATA CTTTCTTTA TAGCGTAAAG AAGACGTAG ATACAGCAA
 -23 M K K N I A F L L A S M F V
 *inicio de stII

 901 TTTTCTATTG CTACAAACGC GTACGCTGAG GTTCAGCTGG TGGAGTCTGG CGGTGGCTG GTGCAGCAG GGGGCTCACT CCGTTTGTC TGTGCAGCTT
 AAAAGATAAC GATGTTTGG CATGCGACTC CAAGTCGACC ACCTCAGACC GCCACCGGAC CACGTCGGTC CCGCGAGTGA GGCNAACAGG ACACGTCGAA
 -9 F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
 *inicio de la cadena pesada *CDR-H1

 1001 CTGGCTTCAC CATTAGTGGT TCTGATATAC ACTGGGTGG TCAGGCCCG GGTAAAGGCC TGGATGGGT TGTAGGATT TCTCCTTTATG GCGGCAATAC
 GACCGAAGTG GTAATCACA AGACTATATG TGACCCACGC AGTCGGGGC CCATTCCCG ACCTTACCA ACCATCCFAA AGAGGAATAC CGCGTATG
 26 G F T I S G S D I H W V R Q A P G K G L E W V G R I S P Y G G N T
 *CDR-H2

 1101 TAACTATGCC GATAGCGTCA AGGCGCGTTT CACTATAAGC GCAGACACAT CCAAAACAC AGCCTACCTA CAAATGAACA GCTTAAGAGC TGAGGACACT
 ATTGATACGG CTATCGCAGT TCOCGGCMAA GTGATATTG CGTCTGTGA GGTITTTGTG TCGGATGGAT GTTACTTGT CGAATCTCG ACTCCTGTGA
 59 N Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T

 1201 GCGTCTATT ATTGTGCAAG AGTCGGCGGC CTCAGTTGC TGTTCGACTA CTGGGTCAA GGAACACTAG TCACCGTCTC CTCGGCCTCC ACCAAGGGCC
 CCGCAGATAA TAACACGTTT TCAGCCGCG GAGTTCAACG ACAAGTGTAT GACCCAGTT CTTGTGATC ACTGGCAGG GAGCCGAGG TGGTTCCTCG
 92 A V Y Y C A R V G G L K L L F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P
 *CDR-H3

 1301 CATCGGTCTT CCCCCTGGCA CCCTCTCTCA AGAGCACCTC TGGGGCACA GGGCCCTGG GCTGCTGTT CAAGGACTAC TTCCCGAAC CCGTGACGGT
 GTAGCCAGAA GGGGACCGT GAGGAGGAGT TCTCTGTGAG ACCCCGTGT CCGCGGACC CGACGGACCA GTTCTGTATG AAGGGCTTG GCCACTGCCA
 126 S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V

FIG..29B

1401 GTCGTGGAACTCAGGCGCCC TGACGAGCGG CGTGACACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGGCTGGT GACCGTGCCC
 CAGCACCTTG AGTCCGCGG ACTGGTCGCC GCAGGTGTGG AAGGCGCGAC AGGATGTCAG GAGTCTCTGAG ATGAGGGAGT CGTCGACCA CTGGCACGGG
 159 S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
 1501 TCCAGCAGCT TGGGCACCCA GACCTACATC TGCACGTGA ATCAGAGCC CAGCAACACC AAGGTCGACA AGAAGTTGA GCCAAATCT TGTGACAAAA
 AGGTCGTGA ACCCGTGGGT CTGGATGAG ACGTGCACCT TAGTGTTCGG GTCGTTCTGG TTCCAGCGGT TCCTTCNACT CGGGTTAGA ACACTGTTTT
 192 S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T
 1601 CTCACGCGC CATGAACAG CTAGAGGACA AGGTGGAAGA GCTACTCTCC AAGACTPACC ACCTAGAGAA TGAAGTGGA AGACTCAAAA AACTTGTGG
 GAGTCCCGC GTACTTTGTC GATCTCTCT GATCTCTCTT TCCAGCTTCT CGATGAGAGG TTCTTGATGG TGGATCTCTT ACTTCACCGT TCTGAGTTTT TTGAACAGCC
 226 H G R M K Q L E D K V E E L L S K N Y H L E N E V A R L K K L V G
 *fin de la cadena pesada, inicio de cremallera de leucinas
 1701 GGAGCGCGA AGCTTAGTG GCGGTGGCTC TGGTCCGGT GATTTTGATT ATGAAGAAT GGCAAACGGT AATAAGGGG CTATGACCGA AATGCCGAT
 CCTCGCGCT TTCCGATCAC CGCCACCGAG ACCAAGGCCA CTAATACTAA TACTTTTCTA CCGTTTCCGA TTATTCCTCC GATACGGCT TTTACGGCTA
 259 E R G K L S G G S G S G D F D Y E K M A N A N K G A M T E N A D
 *fin de cremallera de leucinas, proteína de cubierta de gen III (267-fin)
 1801 GAAACGCGC TACAGTCTGA CGCTAAGGC AAAGTTGATT CTGTCGTAC TGATTACGGT GCTGCTATCG ATGTTTTCAT TGGTGACGT TCCGGCCTTG
 CTTTGGCGG ATGTCAGACT GCGATTTCCG TTGTGAATAA GACAGCGATG ACTAATGCCA CGACGATAGC TACCAAAGTA ACCACTGCA AGGCCGGAAC
 292 E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G D V S G L A
 1901 CTAATGGTAA TGGTGCTACT GGTGATTTTG CTGGCTCTAA TTCCCAATG GCTCAAGTCG GTGACGGTGA TAATCACCT TTAATGAATA ATTTCCGTCA
 GATTACCATT ACCACGATGA CCACTAAAC GACCGAGATT AAGGTTTAC CGAGTTCAGC CACTGCCACT ATTATGTGA AATTACTTAT TAAAGGCAGT
 326 N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R Q
 2001 ATATTACCT TCCCTCCCTC AATCGGTTGA ATGTCGCCCT TTGTCTTTA GCGCTGTAA ACCATATGAA TTTTCTATTG ATTGTGACAA AATAACTTA
 TATAAATGA AGGGAGGAG TTAGCCAACT TACAGCGGA AACAGAAAT CCGGACCAT TTGTATACIT AAAAGATAAC TAACACTGTT TTATTGAAAT
 359 Y L P S L P Q S V E C R P F V F S A G K P Y E F S I D C D K I N L
 2101 TTCGTGGTG TCTTTGCTT TCTTTTATAT GTTGCACCT TTATGTATGT ATTTTCTAG TTGCTAACA TACTCGGTA TAAGAGTCT TAA
 AAGGACCCAC AGAACGCA AGAAATATA CAACGGTGA AATCATACA TAAAGATGC AAAGATTGT ATGACGATT ATTCTCAGA ATT
 392 F R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L R N K E S O

FIG._29C

1 ATGAAAAGA ATATCGCAAT TCTTCTTGCA TCTATGTCG TTTTCTCTAT TGCTACAAAT GCCTATGCAT CCGATATCCA GATGACCCAG TCCCCAGCT
TACTTTTCT TATAGCGTAA AGAAGACGT AGATACAGC AAAAAGATA AGATGTTTA CCGATACGTA GGTATAGGT CTACTGGGC AGGGGCTCGA
1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A S D I Q M T Q S P S S
^ inicio de la secuencia señal still ^met
^ inicio de cadena ligera
201 CCCTGTGCGC CTCGTGGGC GATAGGGTCA CCATCACCTG CCGTGCCAGT CAGGATGCT CCACTGGCT AGCTGGGTAT CAACAGAAAC CAGGAAAGC
GGGACAGCGG GAGACACCGG CTATCCCACT GGTAGTGGAC GGCACGCTCA GTCTACACA GGTGACGACA TCGGACCCATA GTTCTCTTTG GTCCTTTTCG
35 L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A
^CDR-L1
201 TCCGAAGCTT CTGATTACT CGGCATCCTT CCTCTACTCT CGAGTCCTT CTGCTTCTC TGGTAGCGGT TCCGGGACGG ATTTCACTCT GACCATCAGC
AGGCTTCGAA GACTAAATGA GCGGTAGGAA GGAGATGAGA CCTCAGGGA GAGCGAAGAG ACCATCGCCA AGGCCCTGCC TAAAGTGAGA CTGGTAGTCG
68 P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
^CDR-L2
301 AGTCTGCAGC CGGAAGACTT CGCAACTTAT TACTGTGAGC AATCTTATAC TACTCTCTCC AGCTTCGGAC AGGTACCCA GGTGGAGATC AAACGAACTG
TCAGACGTCG GCCTTCTGAA GCGTTGAATA ATGACAGTCG TTAGATATG ATGAGGAGGG TCAAGCCTG TCCCATGGGT CCACCTCTAG TTTGCTTTGAC
101 S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V
^CDR-L3
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA TCTGGAACTG CCTCTGTGT GTGCTGCTG AATAACTTCT ATCCAGAGA
ACCGACGTGG TAGACAGAG TAGAAGGGCG GTAGACTACT CGTCAACTTT AGACCTTGAC GGAGACAACA CACGGACGAC TTATTGAAGA TAGGCTCTCT
135 A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACTCC AGGAGACTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
CCGGTTTCAT GTCACCTTCC ACCPATTGCG GGAGGTAGC CCATTGAGG TCCTCTCACA GTGCTCTGTC CTGCTGTTCC TGTCTGGAT GTCGGAGCTCG
168 A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S
601 AGCACCTGA CGGTGAGCAG AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCGTGAAGTC GCCGTCACA AAGAGTTCA
TCGTGGGACT GCGACTCGTT TCGTCTGATG CTCTTTGTGT TTCAGATGCG GACGCTTCAG TGGGTAGTCC CCGACTCGAG CGGCGAGTGT TTCTCGAAGT
201 S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N

FIG._30A

701 ACAGGGGAGA GTGTGGTGCC AGCTCGGTA TGGCTGATCC GAACCGTTTC CGCGTAAGG ACCTGGCATA ACTCGAGGCT GATCCTCTAC GCCGACGCA
 TGTCCTCTCT CACACCACGG TCGAGGCCAT ACCGACTAGG CCGCATTC CCGCATTC TGGACCGTAT TGAGCTCCGA CTAGGAGATG CGGCTGCGT
 235 R G E C G A S S G M A D P N R F R G K D L A O
 *fin de cadena ligera, inicio de etiqueta de gD

 801 TCGTGGCCCT ACTACGCAAG TTCACGTAAA AAGGTTAACT AGAGTTGAG GTGATTTTAT GAAAGAAT ATCGCATTC TTCTTGCAATC TATGTTCTGTT
 AGCACCGGGA TCATCGGTTT AAGTGCATTT TTCCCATGGA TCCTCAACTC CACTAAAATA CTTTTCTTA TAGCGTAAAG AAGAAGCTAG ATACAAGCAA
 -23 M K K N I A F L L A S M F V
 *inicio de still

 901 TTTTCTATTG CTACAAACGC GTACGCTGAG GTTCAGCTGG TGGAGTCTGG CGGTGGCCTG GTGCAGCCAG GGGGCTCACT CGGTTGTCC TGTGACGCTT
 AAAAGATAAC GATGTTTGG CATGGACTC CAAGTCGACC ACCTCAGACC GCCACCGGAC CACGTCGGTC CCCCAGTGA GGCAACACAGG ACACGTCGAA
 -9 F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
 *inicio de cadena pesada
 *CDR-H1

 1001 CTGGCTTCAC CATTACTAAT TCCGATATAC ACTGGGTGCG TCAGGCCCGG GGTAAAGGCC TGGATGGGT TGCTACTATT TATCCTTATG GCGGTATATC
 GACCGAAGTG GTAATGATTA AGGTATATG TGACCCACGC AGTCCGGGGC CCATCCCGG ACCTTACCCA ACATGATAA ATAGGAATAC CGCCCATATG
 26 G F T I T N S D I H W V R Q A P G K G L E W V A T I Y P Y G G Y T
 *CDR-H2

 1101 TTACTATGCC GATAGCGTCA AGGGCGGTTT CACTATAAGC GCAGACACAT CCATAAACAC AGCCTACCTA CAATGAAAC GCTTAAGACC TGAGACACT
 AATGATACGG CTATCGCAGT TCCCGGCAAA GTGATATTCG CGTCTGTGTA GGTGTTTGTG TCGGATGGAT GTTTACTTGT CGAATCTCG ACTCTGTGA
 59 Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T

 1201 GCGTCTATT ATTGTGCAAG AGGGGCGGG ATGGACGGCT ACCTATGGA CTACTGGGT CAAGAACAC TAGTCACGT CTCTCGGC TCCACCAAGG
 CGGCAGATAA TAACACGTTT TCCCGCGCCC TACCTGCGA TGCAATACCT GATGACCCCA GTTCTTGTG ATCAGTGGCA GAGGAGCGG AGGTGGTTCC
 92 A V Y Y C A R G G G M D G Y V M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G
 *CDR-H3

 1301 GCGCATCGGT CTCCCGCTG GCACCTCTCT CCAAGAGCAC CTGTGGGGC ACAGCGGCC TGGGTGCTT GGTCAAGAC TACTTCCCG AACCGGTGAC
 CGGGTAGCCA GAAGGGGAC CGTGGGAGGA GGTCTCTGTG GAGACCCCG TGTGCGCGG ACCGACGGA CCAGTTCCTG ATGAAGGGG TTGGCCACTG
 126 P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T

FIG._30B

1401 GGTGTGCTGG AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGCTCTACA GTCTCTACGA CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCCTG
 CCACAGACC TTGAGTCGCG GGGACTGGTC GCCGCACTGT TGAAGGGCC GACAGGATGT CAGGAGTCCT GAGATGAGGG AGTCGTCCGA CCACTGGCAC
 159 V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V
 1501 CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC CCAGACCTAC ATCTGCAACG TGAATCACA GGCAGCAAC ACCAAGGTG ACAAGAAAGT TGAGCCCAAA TCTTGTGACA
 GGGAGTCTGT CGAACCCGTG GGTCTGGATG TAGACGTGTC ACTAGTGT CCGGTCTGTG TGGTCCAGC TGTTCTTTCA ACTCGGGTTT AGAACACTGT
 192 P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K
 1601 AAACCTCAGG CCGCATGAAA CAGCTAGAGG ACAAGTCTCA AGACTACTC TCCAGAAGT ACCACTAGA GAATGAAGT GCAAGACTCA AAAAATTTGT
 TTTGAGTCCC GCGTACTTTT GTCGATCTCC TGTTCACCT TCTCGATGAG AGTCTCTGA TGGTGGATCT CTTACTTCAC CGTCTGAGT TTTTGAACA
 226 T H G R M K Q L E D K V E L L S K N Y H L E N E V A R L K K L V
 *fin de cadena pesada, inicio de cremallera de leucinas
 1701 CGGGGAGGCC GGAAGCTTA GTGGCGTGG CTCTGGTTCC GGTGATTTTG ATTATGAAA GATGGCAAC GCTAATAGG GGGCTATGAC CGAAATGCC
 GCCCTCGCG CTTTTCGAT CACCGCCACC GAGACCAAG CCACTAAGC TAATACTTTT CTACGTTTG CGATTATTC CCGATATCTG GCTTTTACGG
 259 G E R G K L S G G S G S G D F D Y E K M A N A N K G A M T E N A
 *fin de cremallera de leucinas, inicio de la proteína de cubierta de gen III (267-fin)
 1801 GATGAAAACG CGCTACAGTC TGACGCTAAA GGCAACTTG ATTCTGTCC TACTGATTAC GGTGCTGCTA TCGATGGTTT CATTTGGTGC GTTTCGGGCC
 CTACTTTTGC GCGATGTCAG ACTGCGATTT CCGTTTGAAC TAAGACAGCG ATGACTAATG CCACGACGAT AGCTACCAAA GTAACCACTG CAAAGGCCGG
 292 D E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G D V S G L
 1901 TTGCTAATGG TAATGGTGCT ACTGGTGATT TTGCTGGCTC TAATCCCAA ATGGCTCAAG TCGGTGACGG TGATAATTCA CCTTAATGA ATAAATTCGG
 AACGATTACC ATTACCACGA TGACCACATA AACGACCGAG ATTAAGGGTT TACCGAGTTC AGCCACTGCC ACTATTAAAT GGAATTAAT TATTAAAGGC
 326 A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R
 2001 TCAATATTTA CTTCCCTCC CTCATTCGGT TGAATGTGCG CTTTGTGTCT TTACGGCTGG TAAACCATAT GAATTTTCTA TTGATTGTGA CAAATAAAC
 AGTTATAAAT GGAAGGGAGG GAGTTAGCCA ACTTACAGCG GGAACACAGA AATCCGACCC ATTTGGTATA CTTAAAGAT AACTAACACT GTTTTATTG
 359 Q Y L P S L P Q S V E C R P F V F S A G K P Y E F S I D C D K I N
 2101 TTATTCGCTG GTGCTTTTTC GTTCTTTTTA TATGTTGCCA CCTTATGTA TGTATTTTCT ACGTTTGCTA ACATACCTCG TAATAAGGAG TCTTAA
 AATAAGGCAC CACAGAAACG CAAAGAAAT ATACACCGT GGAATACAT ACATAAAGA TGCAACGAT TGTATGAGC ATTATTCTTC AGAATT
 392 L F R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L R N K E S O

FIG._30C

1 ATGAAAAGA ATATCGCATT TCTTCTTGA TCTATGTCG TTTTCTCTAT TGCTACAAAT GCCTATGCAT CCGATATCCA GATGACCCAG TCCCGAGCT
 TACTTTTCT TATAGCGTAA AGAAGACGT AGATACAGC AAAAAGATA ACGATGTTTA CGGATACGTA GGCTATAGGT CTACTGGGTC AGGGCTCGA
 1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A S D I Q M T Q S P S S
 *met *inicio de cadena ligera
 101 CCCTGTCGC CTCTGTGGC GATAGGTCA CCATCACCTG CCCTGCCACT CAGGATGTGT CCACGTCTGT AGCCTGGTAT CHACAGAAC CAGGAAAGC
 GGGACAGCG GAGACACCCG CTATCCCACT GGTAGTGAC GGCACGGTCA GTCTACACA GGTGACGACA TCGGACCATTA GTTGTCTTTG GTCCTTTTCG
 35 L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A
 *CDR-L1
 201 TCCGAAGCTT CTGATTTACT CGGCATCCTT CTCTACTCTT GGAGTCCCTT CTGGTTCTC TGGTAGGGT TCCGGGAGG ATTTCACCTT GACCATCAGC
 AGGCTTCGAA GACTAAATGA GCCGTAGGAA GGAGATGAGA CCTCAGGGAA GAGGAGAG ACCATCGCCA AGGCCCTGCC TAAAGTGAGA CTGGTAGTCG
 68 P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
 *CDR-L2
 301 AGTCTGCAG CGGAAGACTT CGCAACTTAT TACTGTCTAC ATCTTTATAC TACTCTCCC AGTTCCGAC AGGATACCAA GGTGGAGATC AAACGACTG
 TCAGACGTC GCCTTCTGAA GCGTTGATA ATGACAGTCG TTAGAATAG ATGAGAGGG TGCAGCCTG TCCCATGGTT CCACCTCTAG TTTGCTTGAC
 101 S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V
 *CDR-L3
 401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAA TCTGGACTG CCTCTCTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
 ACCGACGTGG TAGACAGAAG TAGAAGGCG GTAGACTACT CGTCAACTTT AGACTTGAC GGAGACAACA CACGGACGAC TTATTGAAGA TAGGGTCTCT
 135 A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E
 501 GGCCAAAGTA CAGTGGAGG TGGATACGC CCTCCATCG GGTAACTCC AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
 CCGGTTTCAT GTCACCTTCC ACCTATTGCG GGAGGTTAG CCAATTGAGG TCCTCTACA GTGCTCTGTC CTGTCGTTCC TGTCTGGAT GTCGGAGTCG
 168 A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S
 601 AGCACCCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AGTCTACGC CTGCGAAGTC ACCATCAGG GCCTGAGTCT GCCGCTCACA AAGAGCTTCA
 TCGTGGGACT GCGACTCGTT TCGTCTGATG CTCTTTGTGT TTCAGATCG GACGTTTCAG TGGGTAGTCC CGGACTCGAG CGGGCAGTGT TTCTCGAAGT
 201 S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N

FIG._31A

701 ACAGGGGAGA GTGTGGTGCC AGCTCCGGTA TGGTGATCC GAACGTTTC CGCGTAAGG ACCTGGCAT ACTGAGGCT GATCCTCTAC GCCGGACGCA
 TGTCCCTCT CACACCACGG TCGAGGCCAT ACCGACTAGG CTTGGCAAG GCGCATTC TGGACCGTAT TGAGCTCCGA CTAGGAGATG CGGCCTCGT
 235 R G E C G A S S G M A D P N R F R G K D L A O
 ^fin de la cadena ligera, inicio de la etiqueta gD
 801 TCGTGGCCCT AGTACGCAAG TTCACGTAA AAGGTAAC AGAGTTGAG GTGATTTTAT GAAAAGAAT ATCGATTTC TTCTTCATC TATGTTCTGT
 AGCACCGGA TCATGCGTTC AGTGCATTT TTCCCATGA TCTCCAATC CACTAAATA CTTTTCTTA TAGCGTAAAG AAGAACGTAG ATACAAGCAA
 -23 M K K N I A F L L A S M F V
 ^inicio de still
 901 TTTTCTATTG CTACAAACGC GTACGCTGAG GTTCAGCTGG TGGAGTCTGG CCGTGGCCTG GTGACGCCAG GGGGCTCACT CCGTTGTCC TGTGACGCTT
 AAAAGATAAC GATGTTTGG CATGCGACTC CAAGTCGACC ACCTCAGACC GCCACGGGAC CACGTCGGTC CCCCAGTGA GGCAACACAGG ACACGTCGAA
 -9 F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S
 ^inicio de cadena pesada ^CDR-H1
 1001 CTGGCTTCAC CATTAATAAT TATGATATAC ACTGGTGCG TCAGGCCCGG GGTAAGGGCC TGGATGGGT TGGTTATATT TCTCTCCTA CGCGCGCTAC
 GACCGAAGTG GTAATTATTA ATACTATATG TGACCCACGC AGTCGGGGC CCATCCCGG ACCTPACCCA ACCAATATAA AGAGGAGGAT CGCCGCGATG
 26 G F T I N N Y D I H W V R Q A P G K G L E W V G Y I S P S G A T
 ^CDR-H2
 1101 TTAATATGCC GATAGCGTCA AGGGCCGTTT CACTATAAGC GCAGACACAT CCAAAACAC AGCCPACCTA CAAATGAACA GCTTAAGAGC TGAGGACACT
 AATGATACGG CTATCGCAGT TCCCGGCAA GTGATATTGG CGTCTGTGA GGTCTTGTG TCGGATGGAT GTTTACTTGT CGAATCTCG ACTCCCTGTA
 59 Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T
 1201 GCCGTCTATT ATTGTGCAAG AATGGTCGGC ATGCGGAGGG GGGTTATGGA CTACTGGGGT CAAGGAACAC TAGTCACCGT CTCCTCGGCC TCCACCAAGG
 CGGCAGATAA TAACACGTTT TTACCAGCG TACGCTCCC CCCAATACCT GATGACCCCA GTTCCTTGTG ATCAGTGGCA GAGGAGCCGG AGGTGGTTCC
 92 A V Y Y C A R M V G M R R G V M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G
 ^CDR-H3
 1301 GCCATCGGT CTTCCCTCTG GCACCTCTC CCAAGAGCAC CTCTGGGGG ACAGCGGCC TGGGTGCTT GGTCAAGGAC TACTTCCCG AACCGGTGAC
 CGGGTAGCCA GAAGGGGGAC CGTGGGAGGA GGTCTCTGTG GAGACCCCG TGTCGCCGG ACCCAGCGA CCAGTCTCTG ATGAAGGGG TTGGCCACTG
 126 P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T

FIG._31B

1401 GGTGCTGTGG AACTCAGGGG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTCTCCCTACA GTCCCTCAGGA CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCCGTG
 CCACAGCACC TTGAGTCCGC GGGACTGGTC GCCGACGCTG TGAAGGGGCC GACAGGATGT CAGGAGTCCT GAGNTAGGG AGTCGTCCGA CCACTGGCAC
 159 V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V
 1501 CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC CCAGACCTAC ATCTGCAACG TGAATCACA GCCAGCAAC ACCAAGGTGC ACAAGAAAGT TGAGCCCAAA TCCTGTGACA
 GGGAGGTGCT CGAACCCGTG GGTCTGGATG TAGACGCTGC ACTAGTGTG CGGCTCGTTG TGGTCCAGC TGTCTCTTCA ACTCGGGTTT AGAACACTGT
 192 P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K
 1601 AAATCACGG CCGCATGAA CAGCTAGAGG ACAAGTGA AGAGCTACTC TCCAGAAGT ACCACTAGA GAATGAAGT GCAAGACTCA AAAAATTTGT
 TTTGAGTGCC GGGTACTTT GTGATCTCC TGTCCAGCT TCTCGATGAG AGGTTCTTGA TGGTGGATCT CTTACTTCAC CGTCTGAGT TTTTGAACA
 226 T H G R M K Q L E D K V E E L L S K N Y H L E N E V A R L K K L V
 *fin de cadena pesada, inicio de cremallera de leucinas
 1701 CGGGGAGGCG GGAAGCTTA GTGGCGGTGG CTCTGGTTCC GGTGATTTTG ATTATGAAA GATGGCAAC GCTAATTAAGG GGGCTATGAC CGAAAATGCC
 GCCCTCGCG CCTTTCGAAT CACCGCCACC GAGACCAAGG CCACTAAAC TAATACTTTT CTACCGTTTG CGATTATTC CCGGATACCTG GCTTTTACGG
 259 G E R G K L S G G G S G S G D F D Y E K M A N A N K G A M T E N A
 *fin de cremallera de leucinas
 *proteína de cubierta del gen II (267-fin)
 1801 GATGAAAACG CGCTACAGTC TGACGCTAAA GGCANAACCTG ATTCTGTGCG TACTGATTAC GGTGCTGCTA TCGATGGTTT CATTTGGTAC GTTTCGGGCC
 CTACTTTTGC GCGATGTCAG ACTGCGATT CTGTTTGAAC TAAGACAGCG ATGACTAATG CCACGACGAT AGCTACCCAA GTAACCACTG CAAAGGCCGG
 292 D E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G D V S G L
 1901 TTGCTAATGG TAATGGTGCT ACTGGTGATT TTGCTGGCTC TAATCCCAA ATGGCTCAAG TCGGTGACGG TGATAATCA CCTTAATGA ATAAATTCGG
 AACGATTACC ATTACCACGA TGACCACTAA AACGACCGAG ATTAAGGGTT TACCGAGTTC AGCCACTGCC ACTATTAACT GGAATTAAGT TATTAAGGC
 326 A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R
 2001 TCAATATTTA CCTTCCCTCC CTCATCGGT TGAATGTGCG CCTTTTGCT TTAGCGCTGG TAACCATAT GAATTTTCTA TTGATTGTGA CAAAATAAAC
 AGTTATAAAT GGAAGGGAGG GAGTTAGCCA ACTTACAGCG GGAACACAGA AATCGGACC ATTTGGTATA CTTAAAAGAT AACTAACACT GTTTTATTG
 359 Q Y L P S L P Q S V E C R P F V F S A G K P Y E F S I D C D K I N
 2101 TTATTCGGTG GTGCTTTTGA TATGTTGCCA CCTTATGTA TGTATTTCT ACGTTTGCTA ACATACCTCG TAAATAGGAG TCCTAA
 AATAAGGCAC CACAGAAACG CAAAGAAAT ATACACCGT GGAATACAT ACATAAAGA TGCAACGAT TGTATGACGC ATTATTCCTC AGAATT
 392 L F R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L R N K E S O

FIG._31C

GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC TCATTGCTGA GTTGTATATT AAGCTGCCC AAAAAGAAGA AGAGTCGAAT
CTTAAGTTGA AGAGGTATGA AACCTATTCC TTATATGCTG TACTTTTTAG AGTAACGACT CAACAATAAA TTCGACGGG TTTTTCTCT TCTCAGCTTA

GAACTGTGTG CGCAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT TCGCAATATG GCGCAAAATG ACCAACAGCG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG
CTTGACACAC GCGTCCATCT TCGNAACCTC TAATAGCAGT GAGCTTACGA AGCCTATAC CGCGTTTTAC TGGTTCTCGC CAACTAACTA GTCCATCTCC

GGCGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCCCTGA CGACGNTACG GAGCTGCTGC GCGATTACGT AAAGAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTCAGTA
CCCGCGACAT GCTCCATTTC GGGCTACGGT CGTAAGGACT GCCTCTATGC CTCGACGACG CGCTAATGCA TTTCCTCAAT AACTTCGTAG GAGCAGTCAT

AAAGTTAAT CTTTCAACA CGTGTCATAA AGTTGTCACG GCGAGACTT ATAGTCGCTT TGTTTTATT TTTTAACTA TTTGTAATA GTACGCAAGT
TTTCAATTA GAAAAGTTGT CGACAGTATT TCAACAGTGC CGGCTCTGAA TATCAGCGAA ACAAAATAA AAATTACAT AAACATTGAT CATCGGTTCA

TCACGTAAA AGGTTATGTA GAGTTTGAGG TGATTTTATG. AAAAAAGATA TCGCATTTCT TCTTGCATCT ATGTTCCGTT TTTCTATTGC TACAAATGCC
AGTGCATTTT TCCCATACAT CTCCAACCTCC ACTAAAATAC TTTTCTTAT AGCCTAAAGA AGAAGCTAGA TACAAGCAAA AAAGATAACG ATGTTACGG

M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A
*inicio de secuencia señal de stII

TATGCAGATA TCCAGTAC CCAGTCCCG AGTCCCTCTGT CCGCTCTGT GGGGATAGG GTCACCATCA CCTGCCGTGC CAGTCAGGAT GTGTCCACTG
ATACGTCTAT AGGTCTACTG GGTACGGGC TCGAGGGGACA GCGGAGACA CCGGTATCC CAGTGTAGT GGACGGCAGC GTCAGTCTTA CACAGGTGAC
Y A D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A
*inicio de cadena ligera
*EcoRV

CTGTAGCCTG GTATCAACAG AAACCAGGAA AAGTCCGAA GCTTCTGATT TACTCGGCAT CCTTCTCTTA CTCTGGAGTC CTTCTCGCT TCTCTGGTAG
GACATCGGAC CATAGTTGTC TTGGTCTCTT TTCGAGGCTT CGAGACTAA ATGACCCGTA GGAAGGAGAT GAGACCTCAG GGAAGAGCGA AGACCCATC
V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S
*CDR-L2

CGGTTCCGGG ACGGATTCA CTCTGACCAT CAGCAGTCTG CAGCCGGAAG ACTTCGCAAC TTATTAATCTT CAGCAATCTT ATACTACTCC TCCACCGTTC
GCCAAGGCC TGCCTAAGT GAGACTGGTA GTGCTCAGAC GTGCGCTTC TGAGCGTTG AATATGACA GTCGTTAGAA TATGATGAGG AGGCTGCAAG
G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T P
*CDR-L3

FIG._32A

801 GGACAGGGTA CCAAGGTGGA GATCAAGGA ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTCTCTTC CGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA ACTGCCTCTG
 CCTGTCCCAT GTTCCACCT CTAGTTTCTT TGACACCGAC GTGGTAGACA GAAGTAGAAG GGCGGTAGAC TACTCTGTCA CTTTAGACCT TGACGGAGAC
 121 G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
 *KpnI
 901 TTGTGTGCTT GCTGATAAC TTCTATCCA GAGAGGCCAA AGTACAGTG AGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCAGGAGA GTGTACAGA
 AACACACGGA CGACTATTG AGATAGGGT CTCTCCGGTT TCATGTCACC TTCCACCTAT TCGGGGAGGT TAGCCCATG AGGTCCTCTT CACAGTGTCT
 155 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E
 1001 GCAGGACAGC AAGGACAGCA COTACAGCCT CAGCAGCACC CTGACGCTGA GCAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCTGCGA AGTCACCAT
 COTCCTGTG GTCTGTCTG GATGTGCGA GTCTGTGCTG GACTGGGACT CGTTCTGCTT GATGCTCTT GTGTTTCAGA TCGGAGCGCT TCAGTGGGTA
 188 Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
 1101 CAGGGCCTGA GTCGCCCGT CACAAGACC TTCACACAGG GAGACTGTG TGCCAGCTCC GGTATGGCTG ATCCGAACCG TTTCGGCGGT AAGGACTGG
 GTCCCGGACT CGAGCGGCA GTGTTCTCG AGTTGTCCC CTCTCACACC ACGTCTGAG CCATACCGAC TAGGCTTGGC AAAGCGCCA TTCCTGGACC
 221 Q G L S S P V T K S F N R G E C G A S S G M A D P N R F R G K D L A
 *fin de cadena ligera, inicio de etiqueta gD
 1201 CATAACTCGA GGCTGATCCT CTACGCCGGA CGCATCGTGG CCTAGTAGC CAAGTTCACG TAAAAAGGT AACTAGAGCT TGAGGTGATT TTATGAAAAA
 GTATTGAGCT CCGACTAGGA GATGCGGCT GCGTAGCACC GGGATCATGC GTTCAAGTGC ATTTTCCCA TTGATCTCCA ACTCCACTAA AATACITTTT
 255 O
 -23
 M K K
 *inicio de stII
 1301 GAATATCGCA TTTCTTCTTG CATCTATGTT CGTTTCTTCT ATTGCTACAA ACGGTACGC TGAGGTTCAG CTGGTGGAGT CTGGCGGTGG CCTGGTGCAG
 CTTATAGCCT AAAGAAGAC GTAGATACAA GCAAAAAGA TAACGATGT TGCGCATGCG ACTCCAAGTC GACCACCTCA GACCGCCACC GGACCCGTC
 -20 N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q
 *inicio de cadena pesada
 *BsiNI

FIG. 32B

1401 CCAGGGGGCT CACTCCGTTT GTCCTGTGCA GCTTCTGGCT TCACCATTAG TGGTCTTGG ATACACTGGG TGCCTCAGGC CCGGGGTAAAG GGCCTGGAAAT
 GGTCCCCCGA GTGAGGCAAA CAGGACACGT CGAAGACCGA AGTGGTAATC ACCAAGAAC TATGTGACCC ACGCAGTCCG GGGCCCATTC CCGGACCTTA
 14 P G G S L R L S C A A S G F T I S G S W I H W V R Q A P G K G L E W
 *CDR-H1
 1501 GGGTTGCTTG GATTGCTCCT TATAGCGCG CTACTGACTA TGGCGATAGC GTCAAGSGCC GTTTCACATAT AAGCGCAGAC ACATCCAAAA ACACAGCCTA
 CCCAACGAAC CTAACGAGGA ATATCGCCG CATGACTGAT ACGCTATCG CAGTTCCCGG CAAAGTGATA TTCCGGTCTG TGTAGGTTTT TGTGTCGGAT
 48 V A W I A P Y S G A T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y
 *CDR-H2
 1601 CCTACAAATG AACAGCTTAA GAGCTGAGGA CACTGCCGTC TATTATTGTC CAAGAGAGG GGGTTGTAC TGGGTGTTTC ACTACTGGG TCAAGGAACA
 GGATGTTTAC TTGTCGAATT CTCGACTCCT GTGAGGCGAG ATATAACAC GTTCTCTCCC CCCGAACATG ACCCACAAGC TGATGACCCC AGTTCCTTGT
 81 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G G L Y W V F D Y W G Q G T
 *CDR-H3
 1701 CTAGTCACCG TCTCCTCGGC CTCACCAAG GGGCATCGG TCTTCCCCCT GGCACCTCC TCCAAGACA CCTCTGGGG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC
 GATCAGTGGC AGAGGAGCCG GAGGTGGTTC CCGGTAGCC AGAAGGGGA CCGTGGAGG AGTTCTCGT GGAGACCCC GTGTCGCCCG GACCCGACGG
 114 L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
 *Apal
 1801 TGGTCAAGGA CTACTTCCCC GAACCGGTGA CGGTGTCGTG GAATCAGGC GCCTGACCA GGGCGTGCA CACCTTCCG GCTGTCTTAC AGTCTCTAGG
 ACCAGTTCTT GATGAAGGGG CTGGGCCACT GCCACAGCAC CTTGAGTCGG CGGCACTGGT CGCCGACCGT GTGGAGGGC CGACAGGATG TCAGGAGTCC
 148 V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G
 1901 ACTCTACTCC CTCAGCAGCG TGGTGACCGT GCCCTCAGC AGCTTGGGA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAATCACA AGCCCAGCAA CACCAAGGTC
 TGAGATGAGG GATCGCTGC ACCACTGSCA CGGGAGGTG TCGAACCCGT GGGTCTGGAT GTAGAGCTTG CACTTAGTGT TCGGGTCTGT GTGTTTCCAG
 181 L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V
 2001 GACAAGAAAG TTGAGCCCAA ATCTTGTGAC AAAATCACC TCTAGAGTGG CGGTGGTCTT GGTTCGGTG ATGTCGGTT GCCGCCGGC GTTTTTATG
 CTCTTCTTTC AACTCGGGTT TAGAACACTG TTTTGAGTGG AGATCTCACC GCACCCGAGA CCAAGGCCAC TACGAGCCAA CGCGGGCCCG CAAAAAATAC
 214 D K K V E P K S C D K T H L O
 2101 CTAGCGCCGC CCTATACCTT GTCTGCCCTCC CCGCGTTGCG TCGCGGTGCA TGGAGCCCGG CCACCTCGAC CTGAATGGAA GCCCGCGGCA CTCGCTAAC
 GATCGCGGGG GGTATGGAA CAGACGGAGG GCGGCACGC AGCGCACGT ACCTCGGCC GGTGGAGCTG GACTTACCTT CGGCGGCCGT GGACGGATTG

FIG._32C

2201 GGATTACCA CTCCAAGAAT TGGAGCCAAAT CAATTCCTTGC GGAGAAGTGT GAATGCGCAA ACCAACCCTT GGCAGAACAT ATCCATCGCG TCCGCGCATCT
 CCTAAGTGGT GAGGTTCTTA ACCTCGGTTA GTTAAGAAGC CCTCTTGACA CTTACGCGTT TGCTTGGGAA CCGTCTTGTA TAGGTAGCGC AGCGGTAGA

 2301 CCAGCAGCCG CACGCGGCGC ATCTCGGGCA GCCTTGGGTC CTGGCCACGG GTGCGCATGA TCCTGCTCCT GTCTGTGAGG ACCCGGCTAG GCTGCGGGG
 GGTCTCGGC GTGCGCGCG TAGAGCCCGT CGCAACCCAG GACCGGTGAC CACGGTACT AGCAGGAGGA CAGCACTCC TGGGCGATC CGACCGCCCC

 2401 TTGCTTACT GGTAGCAGA ATGAATCAC GATACGCGAG CGAAGTGAA GCGACTGCTG CTGCAAAACG TCTGCGACCT GAGCAACAAC ATGAATGGTC
 AACGGAATGA CCAATCGTCT TACTTAGTGG CTATGCGCTC GCTGACACTT GCTGACGAC GACGTTTTGC AGACGCTGGA CTGCTGTGTTG TACTTACCAG

 2501 TTGCGTTTCC GTGTTTCGTA AAGTCTGGAA ACGCGGAAGT CAGCGCCCTG CACCAATTATG TTCTGGATCT GCATCGCAGG ATGCTGCTGG CTACCTGTG
 AAGCCAAAGG CACAAAGCAT TTCAGACCTT TGCGCCTTCA GTCGGGGAC GTGTAATAC AAGCCTAGA CGTAGCTCC TACGACGACC GATGGGACAC

 2601 GAACACCTAC ATCTGTATTA ACGAAGCGCT GGCATTGACC CTGAGTGATT TTCTCTGCTG CCGCGCGCAT CCATACCGCC AGTTGTTTAC CCTCACAACG
 CTTGTGGATG TAGACATAAT TGCTTCGCGA CCGTAAGTGG GACTCACTAA AAGAGACCA GGGCGGCGTA GGTATGCGG TCAACAATG GGAGTGTGC

 2701 TTCCAGTAAC CGGGCATGTT CATCATCAGT AACCGGTATC GTGAGCATCC TCCTCTGCTT CATCGGTATC ATTACCCCA TGAACAGAAA TTCCCGCTTA
 AAGGTCATTG GCCCGTACAA GTAGTAGTCA TTGGGCGATAG CACTCGTAGG AGAGACCAA GTAGCCATAG TAATGGGGT ACTTGCTTTT AAGGGGAAT

 2801 CACGAGGCA TCAAGTGACC AAACAGGAAA AAACCGCCCT TAACATGGCC CGCTTTATCA GAAGCCAGAC ATTAACGCTT CTGGAGAAA TCAACGAGCT
 GTGCCCTCGT AGTTCACTGG TTTGTCTTTT TTTGGCGGGA ATTGTACCGG GCGAATAGT CTTCGGTCTG TAATTGGGAA GACCTCTTG AGTTGCTCGA

 2901 GGACGGGGAT GAACAGGCAG ACATCTGTGA ATCGCTTCAC GACCACGCTG ATGAGCTTTA CCGCAGGATC CGGAATGT AAACGTTAAT ATTTTGTAA
 CCTGCGCTA CTTGTCCGTC TGTAGACACT TAGGGAAGTG CTGGTGGAC TACTCGAAT GCGTCCCTAG GCTTTAACA TTGCAATTA TAAACAATT

 3001 AATTCGGGT AAATTTTGT TAATCAGCT CATTTTAA CCAATAGGCC GAATCGGCA AATCCCTTA TAATCAAAA GAATAGCCG AGTAGGGTT
 TTAAGCGCAA TTTAAAACA ATTTAGTCA GTAAAAATT GGTATCCCG CTTTAGCGGT TTTAGGGAT ATTTAGTTTT CTTATCTGGC TCTATCCCA

 3101 GAGTGTGTT CCAGTTTGA ACAGAGTCC ACTATTAAAG AACGTGACT CCAAGTCAA AGGCGGAAA ACCGTCTATC AGGGCTATGG CCCACTACGT
 CTCACAACAA GGTCAACCT TGTCTCAGG TGATAATT TCACCTGA GGTTCAGTT TCCCGCTTT TCGCAGATAG TCCCGATACC GGTGATGCA

FIG._32D

3201 GAACCATCAC CCTAATCAAG TTTTTCGGG TCAGGTGCC GTAAGCACT AATCGGAAC CCTAAGGGA GCCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAGC
 CTTGGTAGTG GGATTAGTTC AAAAACCCT AGCTCCACGG CATTTCTGTA TTTAGCCTTG GGATTTCCT CGGGGGCTAA ATCTCGAACT GCCCTTTTCG

3301 CGCGGAACGT GCGGAGAAAG GAAGGGHAGA AAGCGAAGG AGCGGCGCT AGGGCGCTGG CAAGTCTAGC GGTACCGTG CGCGTAACCA CCACACCCGC
 GCCGCTTGCA CCGCTCTTTC CTTCCCTTCT TTCCCTTTCC TCGCCCGCGA TCCCGGACC GTTCACATCG CCAGTGGAC GCGCATTTGGT GGTGTGGGCG

3401 CGCGCTTAAT GCGCGCTAC AGGGCGGTC CGATCCTGC CTCGCGCTT TCGGTGATGA CGGTGAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
 GCGCGAATTA CGCGGCGATG TCCCGGCGATG GCTAGGACG GAGCGGCA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACGTCGAGGG CCTCTGCCAG

3501 ACAGCTTGTG TGTAAAGCGA TGCCGGGAGC AGACAAGCC GTCAGGGGT GTCAGGGGT GTTGGGGGT GTCCGGGGC AGCCATGACC CAGTCACGTA
 TGTGGAACAG ACATTCGCCCT ACGGCCCTCG TCTGTTCGGG CAGTCCGCCA CAACGCCCA CAGCCCCGG TCGTACTGG GTCAGTGCAT

3601 GCGATAGCGG AGTGTATACT GGCTTAAC TAAGGCACTA GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG CCGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG
 CGCTATCGCC TCACATATGA CCGAATTGAT ACGCGTAGT CTCGTCTAAC ATGACTCTCA CGTGGTATAC GCCACACTTT ATGGCGTGC TACGCATTCC

3701 AGAAATACC GCATCAGGG CTCCTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGTC GGTGGGTGC GCGGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGGG
 TCTTTTATGG CGTAGTCCG GAGAGGGCA AGAGCGAGT GACTGAGCGA CCGAGGCCAG CAAGCCGACG CCGCTCGCCA TAGTCGAGTG AGTTTCCGCC

3801 TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACCCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAGGCC AGCAAAGCC CAGGAACCGT AAAAAGGCC CGTTGCTGGC
 ATTATGCCAA TAGGTGTCTT AGTCCCTTAT TCGCTCTTCTT CTTGTACACT CGTTTTCGG TCGTTTTCG GTCTTGGCA TTTTTCGGC GCAACGACCG

3901 GTTTTTCAT AGGTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAA AATCAGCGT CAAGTCAGAG GTGGCGAAG CCGACAGGAC TATAAGATA CCAGGCGTTT
 CAAAAGCTA TCCGAGGCG GGGACTGCT CGTAGTGTT TTAGTGCGA GTTCAGTCTC CACCGCTTG GCGTGTCTG ATATTCTAT GGTCCGCAAA

4001 CCCCCTGGA GCTCCCTCGT GCGCTCTCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCTTTC TCCTTCGGG AAGGTGGCG CTTTCTCATA
 GGGGACCTT CGAGGGAGCA CCGGAGGGA CAGGCTGGG ACGCGAATG GCCTATGGAC AGCGGGAAG AGGGAAGCCC TTCCGACCGC GAAAGAGTAT

4101 GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGTCCGTTCTG CTCGAAGCTG GCGTGTGTG ACGAACCCCG CGTTCAGCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG
 CGAGTCCGAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC GAGGTTCGAC CCGACACAG TGCTTGGGG GCAAGTCCGG CTGGCGACGC GGANTAGGCC

4201 TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGCGGTGCT
 ATTGATAGCA GAATCAGGT TGGGCCATTC TGTCCTGAAT AGCGTGAACC GTCGTGGTG ACCATTGTCC TAATCGTCTC GCTCCATACA TCCGCCACGA

FIG._32E

4301 ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGACAGT ATTTGTATC TGGCTCTGC TGAAGCCACT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG
 TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CGGATTGAT CCGATTGAT CTTCTGTCA TAAACCATAG ACGCGAGACG ACTTCGGTCA ATGGAAGCCT TTTTCTCAAC

 4401 GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCAACG CTGCTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GGCAGAAAAA AAGGATCTC AAGAAGATCC
 CATCGAGAAC TAGGCGGTTT GTTTGGTGGC GACCATCGCC ACCAAAAA CAAACGTCG TCGTCTAATG CCGGTCTTTT TTTCTTAGAG TTCTTCTAGG

 4501 TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGGTCA GTGAAACGAA AACTCACGTT AAGGATTTT GGTCTAGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCTTT
 AACTAGAAA AGATGCCCCA GACTGGAGT CACCTGCTT TTGAGTGCAA TTCCCTAAAA CCAGTACTCT AATAGTTTTT CCTAGAAGTG GATCTAGGAA

 4601 TTAAATTAAA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA
 AATTTAATTT TTACTTCAAA ATTTAGTTAG ATTTCATATA TACTCATTTG AACGAGACTG TCAATGGTTA CGAATTAGTC ACTCCGTGGA TAGAGTCGCT

 4701 TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCC TACTCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGCC CCCAGTGTG CAATGATACC
 AGACAGATAA AGCAAGTAGG TATCAACGGA CTGAGGGGCA GCACATCTAT TGATGCTATG CCTCCCGAA TGGTAGACCG GGGTCACGAC GTTACTATGG

 4801 GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATT ATCAGCAATA AACAGCCAG CCGGAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCTG CAACTTTATC CGCTCCATC
 CGCTCTGGGT GCGAGTGGCC GAGGTCTAAA TAGTCGTTAT TTGGTCGGTC GGCTTCCG GCTCGGTCT TCACCAGGAC GTTGAAATAG GCGGAGGTAG

 4901 CAGTCTATTA ATTGTTGCC GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCAGTTAA TAGTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGTGTC AGGCATCGTG GTGTACAGCT
 GTCAGATAAT TAACAACGGC CCTTCGATCT CATTCATCAA GCGGTCAATT ATCAAAACGG TTGCAACAAC GGTAAACGAG TCCGTAGCAC CACAGTGCGA

 5001 CGTCGTTTGG TATGGTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCATGTT GTGCAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC
 GCAGCAAAC ATACCGAAGT AAGTCGAGGC CAAGGGTTGC TAGTCCGCT CAATGTACTA GGGGGTACAA CACGTTTTT CGCCAATCGA GGAAGCCAGG

 5101 TCCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCG AGTGTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATATTTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT
 AGGCTAGCAA CAGTCTTCAT TCAACCGCG TCACAATAGT GAGTACCAAT ACCGTCTGA CGTATTAGA GAATGACAGT ACGGTAGGCA TTCTACGAAA

 5201 TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGLAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGGC CGGCGTCAAC ACGGATATAT ACCGCGCAC
 AGACACTGAC CACTCATGAG TTGGTTCACT AAGACTCTTA TCACATACCG CGCTGCTCA ACGAGAACGG GCCCGAGTTG TGCCCTATTA TGGCGCGGTG

FIG._32F

5301 ATAGCAGAAC TTAAAGTG CTCATCATTG GAAACGTTT TCGGGCGA AAATCTCAA GGATCTTACC GCTCTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC
 TATCGTCTTG AAATTTTCAC GAGTAGTAAC CTTTGTGCAAG AAGCCCGCT TTTGAGAGTT CTAGAAATGG CGACAACTCT AGGTCAAGCT ACATTGGGTG
 5401 TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAATGCCG CAAAAGGGG AATAAGGGGG
 AGCAGGTGGG TTGACTAGAA GTCGTAGAAA ATGAAAGTGG TCGCAAGAC CCACTCGTTT TTGCTCTTCC GTTTTACGGC GTTTTCTCCC TTATTTCCCGC
 5501 ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTCATAT ATTATGAAG CATTATCAG GGTATTGTC TCAAGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT
 TGTGCCCTTTA CAACTTATGA GTATGAGAAG GAAAAGTTA TAATAACTTC GTAATAGTC CCANAAACAG AGTACTCGCC TATGTATAAA CTTACATAAA
 5601 AGAAAAATAA ACAATPAGG GTTCCGGCGA CATTTCCCGG AAAAGTGCCA CTTGACGCT AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACCT ATAAAAATAG
 TCTTTTATT TGTTTATCCC CAAGCGCGT GTAAAGGGG TTTTACGGT GCACTGCAGA TTTTGTGTA ATAATAGTAC TGTAAATGGA TATTTTATC
 5701 GCGTATCAG AGGCCCTTTC GTCTTCAATA CAGGTAGACC TTTCTGAGAG ATGTACAGTG AAATCCCCGA AATTATACAC ATGACTGAAG GAAGGGAGCT
 CGCATAGTGC TCCGGGAAG CAGAAGTTAT GTCCATCTGG AAAGCATCTC TACATGTAC TTTAGGGGCT TTAATATGTG TACTGACTTC CTTCCCTCGA
 5801 CGTCATTCCC TGCCGGGTTA CGTCACCTAA CATCACTGTT ACTTTAAAAA AGTTTCCACT TGACACITTTG ATCCCTGATG GAAACGCAT AATCTGGGAC
 GCAGTAAGGG ACGGCCCAAT GCAGTGGATT GTAGTGACAA TGAATTTTT TCAAGGTGA ACTGTGAAC TAGGCACTAC CTTTTCGGTA TTAGACCCCTG
 5901 AGTAGAAGG GCTTCATCAT ATCAAAATGCA ACGTACAAAG AAATAGGGCT TCTGACCTGT GAAGCAACAG TCAATGGGCA TTTGTATAAG ACAAACTATC
 TCATCTTTCC CGAAGTAGTA TAGTTTACGT TGCATGTTTC TTTATCCCGA AGACTGGACA CTTCTGTTGTC AGTTACCCGT AAACAATATC TGTGTGATAG
 6001 TCACACATCG ACAACCAAT ACAATACAGG TAGACCTTTC GTAGAGATGT ACAGTGAAT CCCCAGAAAT ATACACATGA CTGAAGGAAG GGAGCTCGTC
 AGTGTGTAGC TGTTTGGTTA TGTATGTCC ATCTGGAAG CATCTCTACA TGTACCTTAA GGSGCTTTAA TATGTGACT GACTTCTTC CTTGAGCAG
 6101 ATTCCCTGCC GGGTTAGTGC ACCTAACATC ACTGTTACTT TAAAAAGTT TCCACTGAC ACTTTGATCC CTGATGGAAA ACGCATATC TGGGACAGTA
 TAAGGGACGG CCCAATGCAG TGGATTGTAG TGACAAATGAA ATTTTTCAA AGGTGAACGT TGAAACTAGG GACTACCTTT TCGTATTAG ACCCTGTCTAT
 6201 GAAGGGCTT CATCATATCA AATGCAACGT ACAAGAAAT AGGCTTCTG ACCTGTGAAG CAACAGTCAA TGGCATTTG TATAAGACAA ACTATCTCAC
 CTTTCCCGAA GTAGTATAGT TTACGTTTGA TGTCTCTTTA TCCCGAAGAC TGGACACTTC GTTGTCAAGT ACCGTAAAC ATATTCTGTT TGATAGAGTG
 6301 ACATCGACAA ACCAATACAA TCTACAGGTA GACCTTTCGT AGAGATGTAC AGTGAATCC CCGAAATTTAT ACACATGACT GAAGGAAGGG AGCTCGTCTAT
 TGTAGCTGTT TGGTTATGTT AGATGTCCAT CTGGAAGCA TCTCTACATG TCACCTTAGG GGCTTTAATA TGTGTACTGA CTTCTTCCC TCGAGCAGTA
 6401 TCCCTGCCGG GTTACGTAC CTAACATCAC TGTACTTTA AAAAGTTTC CACTTGACAC TTTGATCCCT GATGGAANAC GCATAATCTG GGACAGTAGA
 AGGACGGCC CAATGCAGTG GATTGTAGT ACAATGAAT TTTTCAAG GTGAACCTG AACTAGGGA CTACCTTTTG CGTATTAGAC CTTGTCTATCT
 6501 AAGGGCTTCA TCATATCAA TGCAACGTAC AAGAAATAG GGCTTCTGAC CTGTGAAGCA ACAGTCAATG GGCATTTGTA TAAGACAAAC TATCTCACAC
 TTCCCGAAGT AGTATAGTTT ACGTTGCATG TTTCTTTATC CCGAAGACTG GACACTTCTG TGTCAAGTTAC CCGTAAACAT ATTCTGTTTG ATAGAGTGTG
 6601 ATCGACAAAC CAATACATC TAGCTGTTTG GTTATGTTAG

FIG. - 32G

```

1  TTCGAGCTCG CCCACATTTG ATTATTGACT AGTATTAAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GGCATATATAT GGAGTTCCGC GTTACATAAC
   AAGCTCGAGC GGGCTGTAAAC TAATAACTGA TCAATTAATTA TCAATTAGTTA ATGCCCCAGT AATCAAGTAT CCGGTATATA CCTCANGGCG CAATGTATTG

101 TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTTG ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA
   AATGCCATTT ACCGGGCGGA CCGACTGGCG GGTGCTGGG GCGGGGTAACT TGCAGTTATT ACTGCATACA AGGGTATCAT TCGCGTTATC CCTGAAAGGT

201 TTGACGTCAA TGGGTGGAGT ATTTACGTA AACTGCCAC TTAGCAGTAC ATCAAGTGA TCATATGCCA AGTACGCCCT CTATTGACGT CAATGACGGT
   AACTGCAGTT ACCCACCTCA TAAATGCCAT TTGACGGGTG AACCGTCACT TAGTTCACAT AGTATACGGT TCATGCGGGG GATAACTGCA GTTACTGCCA

301 AAATGGCCCG CTGGCATTG TGGCCAGTAC ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTGATGC
   TTTACCGGC GACCGTAAT ACGGTCTATG TACTGGAATA CCGTGAAGG ATGAACCGTC ATGTAGATGC ATATCAGTA GCGATAATGG TACCACCTACG

401 GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCATAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA
   CCAAACCGT CATGTAGTTA CCGCACCTA TCSCCAACT GAGTCCCCCT AAAGGTTTCA AGGTGGGTA ACTGCAGTTA CCTCAAAACA AAACCGTGGT

501 AAATCAACGG GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CAATGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGA CCGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTCGT
   TTTAGTTGCC CTGAAGGTT TTACAGCAAT GTTGAGGCGG GGTAACTGCG TTTACCCGCC ATCCGCACAT GCCACCCCTC AGATATATTG GTCTCGAGCA

601 TTAGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGAGC CATCCACGCT GTTTTGACCT CCATAGAAGA CACCGGGACC GATCCAGCT CCGCGGCCCG GAACGGTGCA
   AATCACTTGG CAGTCTAGCG GACCTCTCGG GTAGGTGCGA CAAACTGGA GGTATCTTCT GTGGCCCTGG CTAGGTCCGA GCGCCCGGCC CTTGCCACGT

701 TTGGAACGG GATTCCCCGT GCCAAGAGTG ACCTAAGTAC CGCTATAGA GTCTATAGG CCACCCCTT GGCTTCGTTA GAACGGGCT ACAATTAAAT
   AACCTTGGCG CTAAGGGGCA CGGTCTCTAC TGCAATTCATG GCGATATCT CAGATATCCG GGTGGGGAA CCGAAGCAAT CTTGCGCCGA TGTTAATTAT

801 CATAACTTTA TGTATCATAC ACATACGATT TAGGTGACAC TATAGANTAA CATCCACTTT GCCTTTCTCT CCACAGGTGT CCACCTCCAG GTCCACTGTC
   GTATTGGAAT ACATAGTATG TGTATGCTAA ATCCACTGTG ATATCTTATT GTAGTGAA GTAGTGAA GGTGTCCACA GGTGAGGTC CAGGTTGACG

901 ACCTGGGTC TATCGATTGA ATTCCACCAT GGGATGGTCA TGTATCATCC TTTTCTTAGT AGCAACTGCA ACTGGAGTAC ATTCAGATAT CCAGATGACC
   TGGAGCCCAAG ATAGCTAACT TAAGGTGGTA CCTATCCAGT ACATAGTAGG AAAAGATCA TCGTTGACGT TGACCTCATG TAAGTCTATA GGTCTACTGG
1  M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T
   ^met          *Inicio VL
                        *EcoRV

```

FIG. 33A

1001 CAGTCCCGGA GCTCCCTGTC CGCCTCTGTG GCGGATAGGG TCACCATCAC CTGCGGTGCC AGTCAGGATG TGTCCACTGC TGTAGCCTGG TATCAACAGA
 GTCACGGGCT CGAGGGACAG GCGGAGACAC CGGCTATCCC AGTGTATGCC TCAGTCTCTAC ACAGGTGACG ACATCGGACC ATAGTTGTCT
 25 Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K
 ^CDR-L1
 1101 AACCAAGAAA AGCTCCGAAG CTTCTGATTT ACTCGGCATC CTTCTCTCTAC TCTGAGTCC CTTCTGCTT CTCTGGTAGC GGTCCGGGA CGGATTTCAC
 TTGTTCTCTTT TCGAGGCTTC GAAGACTAAA TGAGCCGTAG GAAGGATG AGACTCAGG GAAGACGAA GAGACCATCG CCAGGCCCT GCCTAAGTG
 59 P G K A P K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T
 ^CDR-L2
 1201 TCTGACCATC AGCAGTCTGC AGCCGGAAGA CTTGCGNACT TATTACTGTC AGCAATCTTA TACTACTCTT OCCACGTTTC GACAGGGTAC CAAGTGGAG
 AGACTGGTAG TCGTCAGACG TCGGCCCTCT GAAGCGTTGA ATATGACAG TCGTTAGNAT ATGATGAGGA GGGTGCAAGC CTGTCCCATG GTTCCACCTC
 92 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E
 ^CDR-L3
 1301 ATCAAACGAA CTGTGGGTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCATCTGA TGAGCAGTTG AATCTGGAA CTGCTTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATTAAT
 TAGTTTGCTT GACACCGACG TGGTAGACAG AAGTAGAAG GCGTAGACT ACTGTCAC ACTGACCTT TTAGACCTT GACGAAGACA ACACACGGAC GACTTATTGA
 125 I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F
 ^Inicio kappa humana
 1401 TCTATCCAG AGAGGCCMAA GTACAGTGA AGGTGGATAA CGCCTCCAA TCGGTAACT CCCAGGAGAG TGTACACAG CAGGACAGCA AGGACACAC
 AGATAGGCTC TCTCCGGTTT CATGTCACCT TCCACCTATT CGCGGAGGT AGCCATTGA GGGTCTCTC ACAGTGTCTC GTCTGTCTGT TCCTGTCTGT
 159 Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T
 1501 CTACAGCCTC AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAGTCTA CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGCCTGAG CTCGCCCTC
 GATGTCGGAG TCGTCGTGGG ACTGCGACTC GTTTCGTCTG ATGCTCTTG TGTTCAGAT GCGGACGCTT CAGTGGGTAG TCCCGGACTC GAGCGGCGAG
 192 Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V
 1601 ACAAGAGCT TCAACAGGGG AGAGTGTTAA GCTTGGCCGC CATGSCCCAA CTTGTTATT GCAGCTTATA ATGTTTACAA ATAAAGCAAT AGCATCACAA
 TGTTCCTCGA AGTTGTCCCC TCTCACAAAT CGAACCGGG GTACCGGGT GAACAAATAA CGTCGATAT TACCAATGTT TATTTCGTTA TCGTAGTGT
 225 T K S F N R G E C O

FIG._33B

1701 ATTTACAAA TAAAGCATTT TTTTCACTGC ATTCTAGTGG TGGTTTGCC AAATCATCA ATGTATCTTA TCATGTCTGG ATCGGGAATT AATTGGGCGC
 TAAAGTGTTT ATTCGTAAA AAAAGTGAGC TAAGATCAAC ACCAAACAGG TTGAGTAGT TACATAGAAT AGTACAGACC TAGCCCTTAA TTAAGCCCGG

 1801 AGCACCATGG CCTGAAATAA CCTCTGAAG AGGAACHTGG TTAGGTATCT TCTGAGGCGG AAAGAACCAG CTGTGGAATG TGTGTCACTT AGGGTGTGGA
 TCGTGTGACC GGACTTTTAT GGAGACTTTC TCCTTGAACC AATCCATAGA AGACTCGCC TTCTTGGTC GACACCTTAC ACACAGTCA TCCCACACCT
 * cambio de C a T, elimina sitio KpnI

 1901 AAGTCCCCAG GCTCCCCAGC AGCAGAAGT ATGCAAGCA TGCATCTCAA TTATCTAGCA ACCAGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGAGAA
 TTCAGGGGTC CGAGGGGTG TCCGTCTCA TACGTTTCT ACGTAGAGT ANTCAAGTGT TGGTCCACAC CTTTCAGGGG TCCGAGGGGT CGTCCGTCTT

 2001 GTATGCAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCATAGT CCGCCCCCTA ACTCGGCCA TCCCGCCCCC AACTCGGCC AGTTCGGCCC ATTCTCGGCC
 CATACGTTT GTACGTAGAG TTAATCAGTC GTTGTATCA GGGCGGGAT TGAGGCGGGT AGGCGGGG TCAAGGCGGG TAAGAGGCGG

 2101 CCATGGGTGA CTAAATTTT TTATTATGC AGAGGCCGAG GCGCCTCGG CCTCTAGCT ATTCAGAAG TAGTGAGAG GCTTTTGTGG AGGCCTAGGC
 GGTACCGACT GATTAAAAA AATAAATACG TCTCCGGCTC CGCGGAGCC GGAGACTCGA TAAGTCTTC ATCACTCTC CGAAAAAAC TCCGGATCCG

 2201 TTTTGCAAA AGCTGTTAAC AGCTTGGAC TGCCCGTCT TTTACAAGT CGTGACTGG AAAACCTGG CATTACCAA CTTAATCGCC TTGCAGCACA
 AAACGTTT TCGACAATTG TCGAACCGT ACCGGCAGCA AAATGTTGCA GCCTGACCC TTTTGGGACC GCAATGGTT GAATTAGCGG ACGTCTGT

 2301 TCCCCCTTC GCCAGCTGGC GTAATAGCA AGAGGCCCGC ACCGATCGC CTTCCCAACA GTTGGTAGC CTGAATGGG AATGGCGCCT GATGGGSTAT
 AGGGGGGAG CGGTGACCG CATATCGCT TCTCCGGCG TGGCTAGCG GAAGGTTGT CAACGCATCG GACTTACCG TTACCGCGGA CTACGCCATA

 2401 TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CGGTATTTCA CACCGCATAC GTCAAGCAA CCATAGTAG CGCCCTGTAG CGCGCATTA AGCGGGCGG GTGTGTGGT
 AAAGAGGAAT GCGTAGACAC GCCATAAAGT GTGGGTATG CAGTTTCGT GGTATCATG CGGGGACATC GCGCGTAAT TCGCGCGGCC CACACCACCA

 2501 TACGGCGAG GTGACCGCTA CACTTGGCAG CGCCCTAGG CCGCTCTCT TCGCTTCTT CCCTTCCTT CTGCGCACGT TCGCGGGCTT TCCCCGTCAA
 ATGCGCGTC CACTGGCGAT GTGAACGTC GCGGATCGC GGGGAGGAA AGCGAGTGA AGCGGGCGAA AGGGGCGATT

 2601 CCTCTAATC GGGGGCTCC TTTAGGGTTC CGATTATAG CTTTACGGCA CCTCGACCC AAAAATCTG ATTTGGTGA TGGTTCAGT AGTGGGCCAT
 CGAGATTTAG CCCCAGGG AAATCCCAAG GCTAATCAC GAATGCCGT GGAGTGGG TTTTGTGAAC TAAACCCACT ACCAAGTGCA TCACCCGGTA

FIG. 33C

2701 CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTTGA CGTTGGAGTC CACGTTCTTT AATAGTGGAC TCCTGTTCCA AACTGGAAAC ACATCAACC CTATCTCGG
 GCGGGACTAT CTGCCAAAAA GCGGGAACCT GCAACCTCAG GTGCAAGAAA TTATCACCTG AGAACAGGT TTGACCTTGT TGTGAGTTGG GATAGAGCCC

 2801 CTATTCTTTT GATTATTAAG GGAATTTGCC GATTTCCGCC TATTTGGTAA AAAATGAGCT GATTTAACAA AAATTTAAGC CGAATTTTAA CAAAATATTA
 GATAGAAAA CTAAATATTC CCTAAACGG CTAAGCCCG ATAACCAATT TTTTACTCGA CTAATTTGTT TTAAATTTGC CTTAAAAATT GTTTTATAAT

 2901 ACGTTTACAA TTTTATGGTG CACTCTCAGT ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAACTCCGCT ATCGCTACGT GACTGGGTCA TGGCTGGGCC
 TGCAATATGTT AAANTACCAC GTGAGAGTCA TGTTAGACGA GACTACGGCG TATCAATTCG GTTGAGGGCA TAGCGATGCA CTGACCCAGT ACCGACGGCG

 3001 CCGACACCCG CCAACACCCG CTGACGGCC CTGACGGGCT TGTCTGCTCC CGGCATCCG TTACAGACAA GGTGTGACCG TCTCCGGGAG CTGCATGTGT
 GGCTGTGGC GGTGTGGGC GACTGCGGG GACTGCCCGA ACAGACGAGG CCCGTAGGGC ATGTCTCTGTT CGACACTGGC AGAGGCCCTC GACGTACACA

 3101 CAGAGGTTTT CACCGTCATC ACCGAACGC GCGAGGCAGT ATTCTTGAAG ACGAAGGGC CTCGTGATAC GCTATTTTTT ATAGGTTAAT GTCATGATAA
 GTCTCCAAAA GTGGCAGTAG TGGCTTTGGC CGCTCCGTC TAAGAATTC TGCTTTCCG GAGCACTATG CGGATAAAAA TATCCAATTA CAGTACTATT

 3201 TAATGGTTTC TTAGACGTCA GGTGGCACIT TTCCGGGAAA TGTCGGCGGA ACCCTATTT GTTTATTTTT CTAATATCAT TCAATATATGT ATCCGCTCAT
 ATTACCAAG AATCTGCAGT CCACCGTGAA AGCCCTTT ACACGCCCT TGGGATAAA CAAATAAAAA GATTTATGTA AGTTTATACA TAGGCGAGTA

 3301 GAGACATAA CCTTGATAA TGCTTCATA ATATTGAATA AGAAGAGTA TGAGTATTC AATTTCCGT GTCCGCCCTTA TTCCCTTTTT TCGGGCATTT
 CTCTGTATT GGGACTATTT ACGAAGTTAT TATAACTTTT TCCTTCTCAT ACTCATAGT TGTAAAGGCA CAGCGGGAAT AAGGAAAAA ACGCCGTAAA

 3401 TGCCTTCCTG TTTTGTCTCA CCCAGAACG CTGCTGAAG TAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG GATCTCAACA
 ACGGAAGGAC AAAAAGAGT GGGTCTTGC GACCACCTTC ATTTCTACG ACTTCTAGTC AACCCACGTG CTCACCCAAT GTAGCTTGAC CTAGAGTTGT

 3501 GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCCGCCCG AAGAACGTTT TCCATGATG AGCACTTTTA AGTTCTGCT ATGTGGGCG GTATTATCCC GTGATGACGC
 CGCCATTCTA GGAATCTCA AAAGCGGGC TTCTTGCAAA AGGTTACTAC TCGTGAAAAT TTCAAGACGA TACACCGCGC CATAATAGGG CACTACTGCG

 3601 GGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGATACA CTATCTCAG AATGACTGG TTGAGTACTC ACCAGTACA GAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA
 GCGCGTCTC GTTGAGCCAG CGGCGTATGT GATAAGATC TTAAGTGAAC AACTCATGAG TGGTCAGTGT CTTTTCGTAG AATGCCTACC GTACTGTCAT

FIG._33D

3701 AGAGAATTAT GCACTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACG GCTTTTTCG
 TCTCTTAATA CGTCACGACG GTATTGGTAC TCACTATTGT GACGCGGTT GAATGAAGAC TGTGCTAGC CTCCTGGCTT CCTCGATTGG CGAATAACG
 3801 ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCCTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAACGGA CGAGCGTGAC ACCAGATGC CAGCAGCAAT
 TGTGTACCC CCTAGTACAT TGACGGGAAC TAGCAACCTT TGGCCTCGAC TTACTTCGGT ATGGTTGCT GCTCGCACTG TGGTGTACG GTCGTCGTTA
 3901 GGCAACACG TTGGCCAAAC TATTAACTGG CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA
 CCGTTGTTGC AACGCTTTG AATATTGACC GCTTGATGAA TGAGATCGAA GGGCGTTGT TAATTATCTG ACCTACCTCC GCCTATTCA ACGTCTGGT
 4001 CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG GGGCCAGATG
 GAAGACGCGA GCCGGGAAG CCGACCGACC AAATAACGAC TATTTAGACC TCGGCCACTC GCACCCAGAG CGCATAGTA ACGTCTGTAC CCCGCTCTAC
 4101 GTAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA
 CATTCCGGAG GGCATAGCAT CAATAGATGT GCTGCCCTC AGTCCGTTGA TACCTACTTG CTTTATCTGT CTAGCGACTC TATCCAGGA GTGACTAATT
 4201 GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT TAAACTTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTGTAT
 CGTRACCATT GACAGTCTGG TTCAAAATGAG TATATATGAA ATCTAACTAA ATTTGAAAT AAAAATTAH TTTTCCTAGA TCCACTTCTA GGAATAACTA
 4301 AATCTCATGA CCAAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT TTTTTCCTGC
 TTAGAGTACT GGTTTTAGG AATTGCATC AAAGCAAGG TGACTCCGAG TCTGGGGCAT CTTTCTTAGT TTCCTAGAG AACTCTAGGA AAAAAGACG
 4401 GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTCGCGG ATCAAGAGCT ACCAATCTTT TTTCCGAGG TAACCTGGCTT
 CGCATTAGAC GACGAACGTT TGTTCCTTTG GTGGCGATGG TCGCCACCAA ACAACGGCC TAGTCTCGA TGGTTGAGAA AAAGGCTTCC ATTGACCGAA
 4501 CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACACTT CAAGAATCT GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA
 GTCGTCTCGC GTCTATGGTT TATGACAGGA AGATCACATC GGATCAATC CCGTGTGAA GTTCTTGAGA CATCGTGCGG GATGTATGGA GCGAGACGAT
 4601 ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCTT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGAGATAGT TACCGGATAA GCGCAGCGG TCGGGCTGAA
 TAGGACANTG GTCACCGACG ACGGTCACCG CTATTTCAGCA CAGATGACC CAACTGAGT TCTGTATCA ATGSCCTATT CCGCGTCCG AGCCGACTT

FIG. 33E

4701 CGGGGGGTTT GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCATTGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG
 GCCCCCCAAG CACGTGTGTC GGTTCGNACC TCGCTTGTG GATGTGGCTT GACTCTATGG ATGTGCACT CGTAACCTTT TCGCGGTGCG AAGGCTTCC

4801 GAGAAAGCGG GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAACGCCCT GGTATCTTTA TAGTCCTGTC
 CTCCTTCCGC CTGTCCATAG GCCATTGCGC GTCCAGCCT TGTCTCTCG GGTCTCCCT CGAAGGTCCC CTTTGGCGA CCATAGAAAT ATCAGGACAG

4901 GGGTTTCCGC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGAT GCTCTCAGG GGGCGGAGC CTATGGA AAA ACAGGCAA CGCGGCTTTT TTACGGTTCC
 CCCAAGCGG TGGAGACTGA ACTGCACTGA AAAAACAATA CGAGCAGTCC CCGCGCTCG GATACCTTTT TCGGTCTGTT GCGCCGGA AAATGCCAAGG

5001 TGGCCTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT TCTTCTCTG GTTATCCCTT GATTCTGTG ATAACCGTAT TACCGCTTTT GAGTGAGCTG ATACCGTCTG
 ACCGAAAC GACCGGAAA CGAGTGTACA AGAAGGAGC CAATAGGGA CTAAGACACC TATTGGCATA ATGGCGGAAA CTCACCTCGAC TATGGCGAGC

5101 CCGCAGCCGA ACGACCGAGC GCAGCGAGTC AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG AGCGCCCAAT ACGCAACCG CCTCTCCCG CGCGTTGGC GATTCATTAA
 GGCGTCGGCT TGCTGGCTCG CGTCTCTCAG TCACTCGCTC CTTCGGCTTC TCGGGGTTA TCGGTTGGC GGAGAGGGGC GCGCAACCG CTAAGTAATT

5201 TCCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCCGACTGG AAAGCGGGA GTGAGCGCA CGCAATTAAT GTGAGTTACC TCACTCATT GGCACCCAG GCTTTACT
 AGGTCGACCG TGCTGTCCAA AGGGCTGACC TTTCGCCGT CACTCGCGT GCCTTAATTA CACTCAATGG AGTGAGTAAT CCGTGGGTC CGAATGTGA

5301 TTATGCTTCC GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG ATACAAATTT CACACAGGA ACAGCTATGA CCATGATTAC GAATTAA
 AATACGAAG CCGAGCATAC AACACACCTT AACACTCGCC TATTGTTAA GTGTCTCTT TGTCTACT GGTACTAATG CTTAATT

FIG._33F

```

1  ATTCCAGCTC GCCCGACATT GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTTCAT AGCCCATATA TGGAGTTCCG CGTTACATAA
   TAAGCTCGAG CCGGCTGTAA CTAAATACTG ATCAATAATT ATCATTAGTT ATGCCCCCAG TAATCAAGTA TCGGGTATAT ACCTCAAGGC GCAATGTATT

101 CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAGCACC CCGGCCCATT GACGTCATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
   GAATGCCATT TACCGGGCGG ACCGACTGGC GGGTTGCTGG GGGCGGGTAA CTCGAGTTAT TACTGCATAC AAGGTATCA TTGCGGTAT CCCTGAAAGG

201 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTACGGT AAACCTGCCA CTGGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTAGCCCC CCTATTGACG TCAATGACGG
   TAACTGCAGT TACCCACCTC ATAAATGCCA TTTGACGGGT GAACCGTCAT GTAGTTTACA TAGTATACGG TTCATGCGGG GGATAACTGC AGTTACTGCC

301 TAAATGGCCC GCTTGGCATT ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG
   ATTTACCGGG CGGACCGTAA TACGGGTTCAT GTACTGGTAT ACCTGMAAG GATGAACCGT CATGTAGATG CATAATCAGT AGCGATAATG GTACCACTAC

401 CGGTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGG TAGCGGTTTG ACTCAGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
   GCCAAACCG TCATGTAGTT ACCCGACCT ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGTTCA GAGTGGGGT AACTGCACTT ACCCTCAAC AAAACCGTGG

501 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCG CCATTGACG CAAATGGCG GTAGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATA GCAGAGCTCG
   TTTTAGTTGC CCTGAAGGT TTTACAGCAT TGTGAGCGG GGTAACACTG GTTTACCCCG CATCCGACA TGCCACCCCTC CAGATATATT CGTCTCGAGC

601 TTTAGTGAAC CGTCAGATCG CCTGGAGACG CCATCCAGCG TGTTTTGACC TCCATAGAAG ACACGGGAC CGATCCAGCC TCCGCGGCGG GGAACGGTGC
   AATCACTTG GCAGTCTAGC GGACCTCTGC GGTAGGTGCG ACAAACTGG AGGTATCTTC TGTGGCCCTG GCTAGGTGCG AGCGCGCGGC CCTTGGCCAGC

701 ATTGGAACGC GGATTCCCG TGCCAGAGT GACGTAAGTA CCGCCTATAG AGTCTATAGG CCCACCCCT TGGCTTCGTT AGAACGGCGG TACAATAAT
   TAACCTTGC CCAAGGGGC ACGGTTCTCA CTGCATTTCAT GGGGATATC TCAGATATCC GGTGGGGGA ACCGAAGCAA TCTTGGCGCG ATGTTAATTA

801 ACATAACCTT ATGTATCATA CACATACGAT TTAGGTGACA CTATAGAATA ACATCCACTT TGCCTTCTC TCCACAGGTG TCCACTCCCA GGTCCAACTG
   TGTATTGGAA TACATAGTAT GTGTATGCTA AATCCACTGT GATATCTTAT TGTAGGTGAA ACGGAAGAG AGGTGTCCAC AGGTGAGGT CCAGGTGAC

901 CACCTCGGTT CTATCGATTG AATCCACCA TGGGATGGTC ATGTATCATC CTTTTCTAG TAGCACTGC AACTGGAGCG TACGCTGAGG TTCAGCTGGT
   GTGGAGCCAA GATAGCTAAC TTAAGGTGTT ACCCTACGAG TACATAGTAG GAAAAGATC ATCGTTGACG TTGACCTCGC ATGGGACTCC AAGTCGACCA

```

1

M G W S C I I L F L V A T A T G A Y A E V Q L V
*inicio de péptido señal
*met
*inicio de cadena pesada
*BsiWI

FIG._34A

1001 GGAGTCTGGC GGTGGCCTGG TGCAGCCAGG GGGCTCACTC CGTTGTCTCT GTGACGCTTC TGGCTTCACC ATTAGTGGTT CTTCGATACA CTGGGTGCGT
 CCTCAGACCG CCACCGGACC ACGTCGGTCC CCGAGTGAG GCAACAGGA CACGTGCAAG ACCGAAGTGG TAATCACCAA GAACTATGT GACCCACGCA
 25 E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T I S G S W I H W V R
 *CDR-H1
 1101 CAGGCCCCGG GTAAGGCGCT GGAATGGGTT GCTTGGATTG CTCCTTATAG CGGCGTACT GACTATGCGG ATAGCGTCAA GGGCGGTTTC ACTATAAGCG
 GTCCGGGGCC CATTCGCGGA CCTTACCCAA CGAACTAAC GAGGATATC GCCGCGATGA CTGATAGGCG TATCGCAGTT CCCGSCAAG TGATATTGCG
 58 Q A P G K G L E W V A W I A P Y S G A T D Y A D S V K G R F T I S A
 *CDR-H2
 1201 CAGACACATC CAAAACACA GCCTACCTAC AAATGAACAG CTTAAGAGCT GAGGACACTG CCGTCTATTA TTGTGCAAGA GAGGGGGCT TGTACTGGGT
 GTCGTGTAG GTTTTGTGT CCGATGGATG TTTACTGTG GATTTCTGA CTCCTGTGAC GGCAGATAAT AACACGTTCT CTCCCCCGA ACATGACCCA
 92 D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G G L Y W V
 *CDR-H3
 1301 GTTCGACTAC TGGGGTCAAG GAACCCCTGT CACGCTCTCC TCGGCTCCA CCAAGGCC ATCGGTCTTC CCCTGGCAC CCTCTCCAA GAGCACCTCT
 CAAGCTGATG ACCCCAGTTC CTTCGGACCA GTGGCAGAGG AGCCGAGGT GGTTCGCGG TAGCCAGAG GGGACCGTG GGAGGAGTT CTCGTGGAGA
 125 F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S
 *Apa1
 1401 GGGGGCACAG CGGCCCTGGG CTGCTGTGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGCTG TCGTGGAACT CAGGCGCCCT GACCAGCGGC GTGCACACCT
 CCCCCGTGTC GCCGGGACCC GACGGACCAG TTCTGTATGA AGGGGCTTG CCACTGACAC AGCACCTTGA GTCCGCGGGA CTGGTCGCGG CACGTGTGGA
 158 G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F
 1501 TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACTGTGCCCT CTAGCAGCTT GGGCACCCAG ACCTACATCT GCAACGTGAA
 AGGGCCGACA GGATGTCAGG AGTCTGAGA TGAGGGAGTC GTCGCACCAC TGACACGGGA GATCGTCGAA CCGTGGGTC TGGATGTAGA CGTTGCACTT
 192 P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N
 1601 TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GAAAGTTGAG OCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG
 AGTGTTCGGG TCGTTGTGGT TCCACCTGTT CTTTCACTC GGGTTTAGAA CACTGTTTGG AGTGTGTAGG GGTGGCACCG GTCTGTGACT TGAGGACCCC
 225 H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G

FIG._34B

1701 GGACCGTCAG TCTTCTCTTT CCCCCCAAA CCCAAGGACA CCTCATGAT CTCCCGGACC COTGAGGTCA CATCGGTGGT GGTGACGTG AGCCACGAAG
 CTTGGCAGTC AGAAGGAGAA GGGGGGTTTT GGGTCTCTGT GGGAGTACTA GAGGGCCTGG GGACTCCAGT GTACGCACCA CCACCTGCAC TCGGTGCTTC
 258 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
 1801 ACCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCAGT ACCGGGTGGT
 TGGGACTCCA GTTCAAGTTG ACCATGCACC TGCCGCACCT CCACGTATTA CGTTCTGTT TCGGCGCCCT CTTGTCATG TTGTCGTGA TGSCCCACCA
 292 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V
 1901 CAGGTCCTC ACCGTCTCTG ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGATACA ACTGCAAGT CTCCAACAAA GCGCTCCAG CCCCCTCGA GAAACCATC
 GTCGACGAG TGGCAGGAG TGGTCTCTGAC CGACTTACCG TTCTCATGT TCACGTTCGA GAGTTGTTT CGGAGGGTC GGGGTAGCT CTTTGTGTAG
 325 S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I
 2001 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAAGACCA CAGGTGTACA CCTGCCCCC ATCCCGGGA GAGATGACCA AGAACAGGT CAGCCTGACC TGCTGGTCA
 AGTTTTCGT TTCCCGTCGG GGTCTCTGGT GTCCACATGT GGGACGGGG TAGGGCCCTT CTCTACTGGT TCTTGGTCCA GTCGGACTGG ACGGACCAGT
 358 S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K
 2101 AAGGTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAG AGTGGGAG CAATGGGAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
 TTCCGAAGAT AGGGTCGCTG TAGCGGCACC TCACCTCTC GTTACCGTC GGCCTCTGT TGTGTTCTG GTGCGAGGG CACGACCTGA GGCTGCCGAG
 392 G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
 2201 CTCTTCTC TACAGCAGC TCACCGTGA CAAGACAGG TGGCAGAG GGAAGCTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
 GAAGAAGGAG ATGTCGTTCG AGTGGCACCT GTTCTCGTCC ACCGTCTCC CTTGACAA GACTACGAGG CACTACGTAC TCCGAGACGT GTTGGTGATG
 425 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
 2301 ACGCAGAAGA GCCTCTCCT GTCTCCGGT AAATGAGTGC GACGGCCCTA GAGTCGACT GCAGAAGCTT GGCCGCCATG GCCCAACTG TTTATTGCAG
 TGCGTCTTCT CGGAGAGGGA CAGAGGCCCA TTTACTCAG TGTCCGGAT CTCAGCTGA CGTCTTCGAA CCGGCGGTAC CCGGTTGAAC AAATAACGTC
 458 T Q K S L S L S P G K O
 2401 CTTTATATGG TTACAATAA AGCAATAGCA TCACAATTT CACAATAA GCATTTTTT CACTGCATTC TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC TCATCAATGT
 GAATATTACC AATGTTTATT TCGTTATCGT AGTGTATAA GTGTTTATT CATAAAAAA GTGACGTAG ATCAACACCA AACAGGTTG AGTAGTTACA

FIG._34C

2501 ATCTTATCAT GTCTGGATCG ATCGGGGAAT AATTCGGCGC AGCACCATGG CCTGAAATAA CCTCTGAAAG AGGAACCTGG TTAGTACCT TCTGAGGCGG
 TAGAANTAGTA CAGACCTAGC TAGCCCTTAA TTAAGCCGCG TCGTGGTACC GGACTTTATT GGAGACTTTC TCCTTGAACC AATCATGGA AGACTCCGCC

 2601 AAAGAACCAT CTGTGGAATG TGTGTCAGTT AGGTGTGGA AAGTCCCGAG GCTCCCCAGC AGGCAGAGT ATGCAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA
 TTCTTTGGTA GACACCTTAC ACACAGTCAA TCCACACCTT TTCAGGGGTC CGAGGGGTCG TCCGTCTTCA TACGTTTCGT ACGTAGAGTT AATCAGTCTG

 2701 ACCAGGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAG CATGCTCTC AATTAGTCAG CAACCATAGT CCGGCCCTTA ACTCCGCCCA
 TGGTCCACAC CTTTCAGGGG TCCGAGGGGT CGTCCGTCTT CATACGTTTC GTACGTAGAG TTAATCAGTC GTTGGTATCA GGGCGGGGAT TGAGGCGGGT

 2801 TCCCGCCCTT AACTCCGCC AGTTCGGCC ATTCCTCGCC CCATGGCTGA CTAATTTTTT TTATTTATGC AGAGGCCGAG GCCGCTCGG COTCTGAGCT
 AGGCGGGGA TTGAGCGGG TCAAGCGGG TAAGAGCGG GGTACCGACT GATTAAAAA AATAAATACG TCTCCGGCTC CGGCGGAGCC GGAGACTCGA

 2901 ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG GCTTTTTTGG AGGCTAGGC TTTTGC AAAA AGCTGTTAAC AGCTTGGCAC TGGCCGTCTG TTTACACAGT CGTGACTGGG
 TAGGTCTTC ATCCTCTCTC CGAAAAACC TCCGGATCCG AAACGTTTT TCGACATTTG TCGAACCTG ACCGCGAGCA AATGTTGCA GCCTGACCC

 3001 AAAACCCCTG CGTTACCCAA CTTAATCGCC TTGCAGCACA TCCCCCTTC GCCAGTGGC GTAATAGCGA AGAGGCCCGC ACCGATCGCC CTTCCCAACA
 TTTTGGGACC GCAATGGGTT GAATTAGCGG AACGTCGTGT AGGGGGGAG CGGTCAACCG CATTATCGT TCTCCGGCG TGGCTAGCGG GAAGGTTGT

 3101 GTGCGTAGC CTGAATGGCG AATGGCGCT GATGCGGTAT TTTCTCTTA CGCATCTGTG CGGTATTTCA CACGCGATAC GTCAAGCAA CCATAGTAGC
 CAACGCATCG GACTTACCGC TTACCGCGGA CTAGCCATA AAAGAGGAT CGGTAGACAC GCATAAAGT GTGCGGTATG CAGTTTCGTT GGTATCATGC

 3201 CGCCCTGTAG CGGGGCATTA AGCGCGCGG GTGTGGTGGT TACGCCAGC GTACCCCTA CACTTGGCAG CGCCCTAGCG CCGCTCCTT TCGCTTTCTT
 GCGGACATC GCCGCGTAAT TCGCGCGGC CACACCACA ATGCGGTCTG CACTGGCGAT GTGAACGCTC GCGGATCGC GGGCAGGAA AGCGAAAGAA

 3301 CCTTCTCTT CTGCGCACGT TCGCCGGCTT TCCCGTCAA GCTCTAAATC GGGGCTCCC TTTAGGTTTC CGATTAGTG CTTTACGGA CCTCGACCCC
 GGGAGGAAA GAGCGGTGCA AGCGGCCGAA AGGGCAGTT CGAGTTTAG CCCCCAGGG AATCCCCAG GCTAATCAC GAATGCCGT GGAGCTGGGG

 3401 AAAAAGTGTG ATTTGGGTGA TGGTTCACGT AGTGGGCCAT CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTTGA CGTTGGAGTC CAGCTTCTTT AATAGTGGAC
 TTTTGTGAAC TAAACCCACT ACCAAGTGCA TCACCCGGTA GCGGGACTAT CTGCCAAAA GCGGGAAACT GCAACCTCAG GTGCAAGAAA TTATCACCTG

FIG._34D

3501 TCTTGTTCCTCA AACTGGACCA ACACCAACCC CTATCTCGGG CTATTTCTTTT GATTATTAAG GGATTTGGCC GATTTCGGCC TATTGGTTAA AAAATGAGCT
 AGAACAGGTG TTGACCTTGT TGTAGCTTGG GATGAGCCC GATAAGAAA CTAATATTTC CTAAGCCGG CTAAAGCCGG ATAAACCAATT TTTTACTCGA

 3601 GATTTAACAA AAATTTAACG CGAATTTTAA CAAAATATTA ACCTTTACAA TTTTATGGTG CACTCTCAGT ACNATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC
 CTAATTTGTT TTTAATTTGC GCTTAAATTT GTTTTATAAT TGCNATGTT AAATATCCAC GTGACAGTCA TGTTAGACGA GACTACGGCG TATCAATTCG

 3701 CAACTCCGCT ATGCTACGT GACTGGGTCA TGGCTGGCC CCGACACCCG CCAACACCCG CTGACGGCC CTGACGGGCT TGCTGTCTCC CGGCATCCCG
 GTTGAGCGA TAGCGATGCA CTGACCCAGT ACCGACGGG GGTGTGGG GACTGCGCG GACTGCGCG ACAGACGAGG GCCGTAGGCG

 3801 TTACAGACAA GCTGTGACCG TCTCCGGGAG CTGCATGTGT CAGAGGTTTT CACCGTCATC ACCGAACGC GCGAGGCGT ATTCTTGAG AGGAAGGGC
 AATGCTGTG CGACACTGGC AGAGGCCCTC GACGTACACA GTCTCCAAA GTGGCAGTAG TGGCTTGG CGCTCCGTC TAAGAACCTC TGCTTTCCCG

 3901 CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT GTCATGATAA TAATGGTTT TTACAGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTCGGCGA ACCCTATTT
 GAGCACATG CGGATATAAA TATCCATTA CAGTACTATT ATTACCAAG AATCTGCAGT CCACGCGTAA AAGCCCTTT ACACGCGCCT TGGGGATAAA

 4001 GTTTATTTTT CTAATATCAT TCNATATGT ATCCGCTCAT GAGACATAA CCTTGATAA TGCTTCAATA ATATTGAAA AGAAGAGTA TGAGTATTCA
 CAAATAAAA GATTTATGTA AGTTTATACA TAGGCGAGTA CTCTGTTAT GGGACTATTT ACGAAGTTAT TATACTTTTT TCTTCTCAT ACTCATAGT

 4101 ACATTTCCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT TGCGGCAATT TGCTTCTCA CCCAGAACG CTGGTGAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG
 TGTAAAGCA CAGCGGGAAT AAGGGAATA ACGCCGTAAA ACGAAGGAC AAAAACGAGT GGGTCTTGC GACCACCTC ATTTCTAGC ACTTCTAGTC

 4201 TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG GATCTCAACA GCGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCCGCCCG AAGAAGCTT TCCAATGATG AGCACTTTTA
 AACCACGTG CTCACCCAT GTAGCTGAC CTAGAGTTGT CGCATTTCTA GGAATCTCA AAGCGGGG TTCTTGCAA AGGTTACTAC TCGTGAAAT

 4301 AAGTTCTGCT ATGTGGCGG GTATTATCCC GTGATGACG CCGGCAAGAG CAACTCGGTG CCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGACTACTC
 TTCAAGACGA TACACCGCG CATATATAGG CACTACTGCG GCCGTTCTC GTTGAGCCAG CGGCTATGT GATAAGATC TTAAGAAC AACTCATGAG

 4401 ACCAGTCACA GAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA AGAATTTAT GCAGTGTGC CATACCATG AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG
 TGGTCAGTGT CTTTTCGTAG AATGCCATCC GTACTGTGAT TCTCTTAATA CGTCACGAG GTATTGGTAC TCACATATGT GACGCCGTT GAATGAAGAC

 4501 ACACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAAC GCTTTTTTTC ACACATGGG GGATCATGTA ACTCCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA
 TGTGTGTAGC CTCCTGGCTT CCTCGATTGG CGAAAAACG TGTTGTACCC CTTAGTACAT TGAGCGGAAC TAGCAACCT TGGCCTCGAC TTACTTCGGT

FIG._34E

4601 TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CAGCAGCAAT GGCACCAACG TTGCCAAAC TATTAACTGG CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA
 ATGGTTTGCT GCTCGACTG TGGTGCTACG GTGTCGTGTA CCGTTGTTG AACGGTTTG ATAATTGACC GCTTGATGAA TGAGATCGAA GGGCCCTGT
 4701 ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATNAAGT TGCAGGACCA CTCTCGCGT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAACTCTGG AGCCGGTGAG
 TAATTATCTG ACCTACCTCC GCCTATTICA ACCTCCTGCT GAAGACGCGA GCCGGGAAG CCGACCGACC AAATAACGAC TATTAGACC TCGGCCACTC
 4801 CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG GGGCCAGATG GTAAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC
 GCACCCAGAG CGCCATAGTA ACGTCGTGAC CCGCGTCTAC CATTCGGGAG GGCAATGAT CAATAGATGT GCTGCCCTC AGTCCGTTGA TACCTACTTG
 4901 GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTGAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACTTCA
 CTTTATCTGT CTAGGACTC TATCCACGGA GTGACTAATT CGTAACCAAT GACAGTCTGG TTCAATGAG TATATATGAA ATCTAACTAA ATTTTGAAGT
 5001 TTTTAAATTT AAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTGAT AATCTATGA CCNAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTGCC ACTGAGCGTC AGACCCGTA
 AAAAATTAA TTTTCTAGA TCCACTTCTA GGAANAATA TTAGATACT GGTTTAGGG AATTGCACTC AAAAGCAAGG TGACTCGCAG TCTGGGGCAT
 5101 GAAAGATCA AAGGATCTT TTGAGATCT TTTTCTCTG CCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAC CACCGCTACC AGCGTGTTT TGTTCGCGG
 CTTTCTTAGT TTCTTAGAAG AACTCTAGGA AAAAAGACG CGCATTAGAC GACGAACGTT TGTTCCTTG GTGGCGATGG TCGCCACCAA ACAACGGCC
 5201 ATCAAGAGCT ACCAATCTT TTTCCGAAG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCTT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCCTT
 TAGTTCTCGA TGGTTGAGAA AAAGGCTTCC ATTGACCGAA GTCGTCTCG GTCTATGGTT TATGACAGGA AGATCACATC GGCATCAATC CGTGGTGAA
 5301 CAAAGACTCT GTAGACCGC CTACATACCT CGCTCTGTA ATCTGTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCTG GTCTTACCGG GTTGGACTCA
 GTTCTTGAGA CATCGTGGC GATGTATGGA GCGAGACGAT TAGGACAATG GTCACGACG ACGGTCAACG CTATTCAGCA CAGATGGCC CAACCTGAGT
 5401 AGACGATAGT TACCGGATAA GCGCGAGCGG TCGGCTGAA CCGGGGTTTC GTGCACACAG CCCAGCTTG AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC
 TCTGCTATCA ATGGCTATT CCGCGTGGC AGCCCGACTT GCCCCCAAG CACGTGTGC GGGTCGAACC TCGCTTGCTG GATGTGGCTT GACTCTATGG
 5501 TACAGCGTGA GCATTGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAG GAGAAAGCG GACAGTATC CCGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA
 ATGTCGCACT CGTAATCTT TCGCGGTGCG AAGGCTTCC CTCCTTCCG CTGTCCATAG GCCATTGCG GTCCCAGCTT TGTCTCTCTG CGTGTCTCCT
 5601 GCTTCCAGG GGAACGCCCT GGTATCTTTA TAGTCTCTG GGGTTTCGCC ACCTGACT TGAGCGTGA TTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGCGGAGC
 CGAAGGTCCC CCTTTGGGA CCATAGAAAT ATCAGGACAG CCCAAAGCG TGGAGACTGA ACTCGCAGCT AAAAACACTA CGAGCAGTCC CCCCCTCTCG

FIG._34F

5701 CTATGGAAA ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT TTACGGTTCC TGGCCCTTTT CTGGCCCTTT GCTCACATGT TCCTTCCTGC GTTATCCCTT GATTCTGTGG
 GATACCTTTT TCGCGTCGTT GCGCCGGAAA AATGCCAAGG ACCGGAAAC GACCGGAAA CGAGTGATACA AGAAGGACG CAATAGGGA CTAAGACACC

 5801 ATAACCGTAT TACCGCCTTT GAGTGAGCTG ATACCGCTCG CCGCAGCGA ACCACCGAGC GCAGCGAGTC AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG AGCGCCCAAT
 TATTGGCATA ATGGCGGAAA CTCACTCGAC TATGGCGAGC GCGCTCGCT TGTGGCTCG CGTCGCTCAG TCACCTCGCTC CTTCGCCCTC TCGCGGGTTA

 5901 ACGCAAACCG CCTCTCCCG CGCGTTGGCC GATTCATTAA TCCAACTGGC ACACACAGGT TCCCGACTGG AAACGGGCA GTGAGCGCAA CGCAATTAAAT
 TCGCTTTGGC GGAGAGGGC GCGCAACCG CTAAGTAAT AGGTTGACCG TGCTGTCCAA AGGCTGACC TTTCGCCCGT CACTCGCGTT GCGTTAATTA

 6001 GTGAGTTACC TCACTCATTA GGCACCCAG GCTTTACACT TTATGCTTC GGCTCGTATG TTGTGTGAA TTGTGAGCGG ATAACAATTT CACACAGGAA
 CACTCAATGG AGTGAGTAAT CCGTGGGGTC CGAATGTGA AATACGAGG CCGAGCATAC AACACACCTT AACACTCGCC TATTGTTAAA GTGTGTCCTT

 6101 ACAGCTATGA CCATGATTAC GAATTA
 TGTCGATACT GGTACTAATG CTTAAT

FIG._34G

28	S	511	N	262	V	258	D	186	G	178	I	44	T	39	L	16	X	35
29	I	612	S	272	V	254	G	192	N	147	X	70						
30	S	849	N	176	K	169	G	86	R	81	Y	63	T	29	D	28	A	17
31	S	676	N	496	T	170	R	47	I	29	D	28	K	25	G	18	X	53
32	Y	1055	N	128	W	97	F	77	S	61	D	40	R	25	X	69		
50	G	386	A	341	D	294	W	151	K	116	L	91	E	39	S	30	X	82
53	S	545	N	438	T	407	K	41	I	23	R	23	X	58				
91	Y	849	S	196	R	169	A	118	G	61	H	41	X	148				
92	Y	362	G	356	N	248	S	193	D	114	L	94	T	64	H	43	I	38
93	S	738	N	346	Q	117	T	101	H	66	G	51	D	47	R	35	X	91
94	S	386	T	365	W	288	Y	172	L	114	F	79	A	46	P	43	I	24
96	L	264	Y	205	W	176	F	140	I	117	R	115	P	46	X	121	N	18
																		40

FIG.-35

Residuo	Diversidad natural	Diversidad < codón de ADN	% bueno	% cubrimiento
L1-28	SNVDGI	SNVDGI<RDT>	100%	94%
L1-29	ISVGN	ISVG<RKT>	100%	86%
L1-29		IV<RTT>	100%	56%
L1-30	SNKGRYTDA	SNKGGRTTDAAE<RVW>	92%	93%
L1-31	SNTRIDKG	SNTTRDKGGAAE<RVW>	75%	95%
L1-31		SNTTRIHK<ANW>	100%	94%
L1-32	YNWFSDR	YNFSDATIV<DHT>	55%	88%
L1-32		YFS<THT>	100%	77%
L2-50	GADWKLES	GAWLSV<KBG>	83%	67%
L2-53	SNTKIR	SNT<AVC>	100%	90%
L3-91	YSRAGH	YSAD<KMT>	75%	74%
		YS<TMT>	100%	66%
L3-92	YGNSDLTHI	YNSDTIFAV<DHT>	67%	64%
		YNSDTA<DMC>	83%	62%
L3-93	SNQTHGDR	SNTGDA<RVT>	83%	80%
		SNTDYAFIV<DHT>	44%	76%
L3-94	STWYLFAPVI	STYLFAPVINDH<NHT>	75%	78%
		STYFIN<WHT>	83%	43%
L3-96	LYWFIRP	LYFPHS<YHT>	67%	52%
		LYFIHN<HWT>	67%	58%
		LFI<HTT>	100%	42%
		LLWR<YKG>	100%	47%
		YF<TWT>	100%	29%

FIG._36

Diversidad diseñada cadena ligera
diversidad : $\sim 2.9 \times 10^9$

CDR-L1: diversidad $\sim 7 \times 10^3$

28	29	30	31	32
RDT	RTT	RVW	RVW	DHT
D	I	D	D	A
G	V	E	E	D
I		G	G	F
N		K	K	I
S		N	N	N
V		S	S	S
		T	T	T
		R	R	V
				Y

CDR-L2: diversidad = 18

50	53
KBG	AVC
A	N
G	S
L	T
S	
V	
W	

CDR-L3 diversidad $\sim 2.3 \times 10^4$

91	92	93	94	96
KMT	DHT	DHT	NHT	YHT
A	A	A	A	F
D	D	D	D	H
S	F	F	F	L
Y	I	I	H	P
	N	N	I	S
	S	S	L	Y
	T	T	N	
	V	V	P	
	Y	Y	S	
			T	
			V	
			Y	

FIG._37

Diversidad diseñada cadena ligera
diversidad : $\sim 6.1 \times 10^8$

CDR-L1: diversity $\sim 3.4 \times 10^3$

28	29	30	31	32
RDT	RTT	RVW	ANW	THT
D	I	D	I	F
G	V	E	K	S
I		G	N	Y
N		K	R	
S		N	S	
V		S	T	
		T		
		V		

CDR-L2: diversidad = 18

50	53
KBG	AVC
A	N
G	S
L	T
S	
V	
W	

CDR-L3 diversidad $\sim 1.0 \times 10^4$

91	92	93	94	96
KMT	DMC	RVT	NHT	YHT
A	A	A	A	F
D	D	D	D	H
S	N	G	F	L
Y	S	N	H	P
	T	S	I	S
	Y	T	L	Y
			N	
			P	
			S	
			T	
			V	
			Y	

FIG._38

Diversidad diseñada cadena ligera

CDR-L3: diversidad- 1.3×10^3

91	92	93	94	96
TMT	DMC	RVT	WHT	HTT
S	A	A	F	F
Y	D	D	I	I
	N	G	N	L
	S	N	S	
	T	S	T	
	Y	T	Y	

FIG._39

CDR-L1

28	29	30	31	32
RDT	RTT	RVW	RVW	DHT
D	I	D	D	A
G	V	E	E	D
I		G	G	F
N		K	K	I
S		N	N	N
V		S	S	S
		T	T	T
		V	V	V
				Y

CDR-L2

50	53
DVK	AVM
A	N
G	K
L	R
S	S
V	T2
W	

CDR-L3

91	92	93	94	96
NRT	NRT	RVM	NNK	TDK
C	C	A2	A	C
D	D	D	C	F
G	G	E	D	L
H	H	G2	E	W
N	N	K	F	Y
R	R	N	G	*
S	S	R	H	
Y	Y	S	I	
		T2	L	
			M	
			N	
			P	
			Q	
			R	
			etc	
			*	

* codón de parada amber es codificado por el codón degenerado

FIG._40

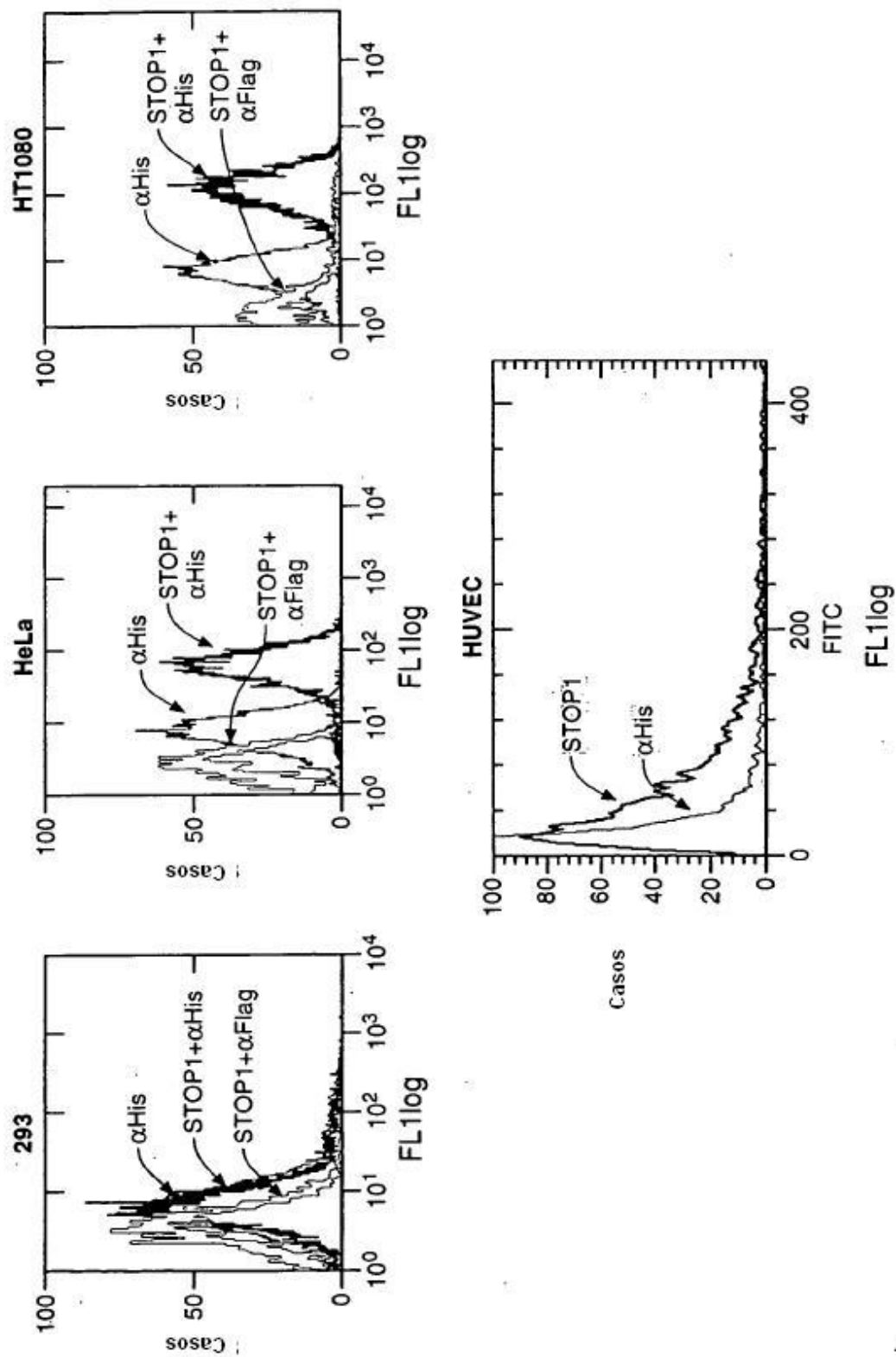


FIG._41

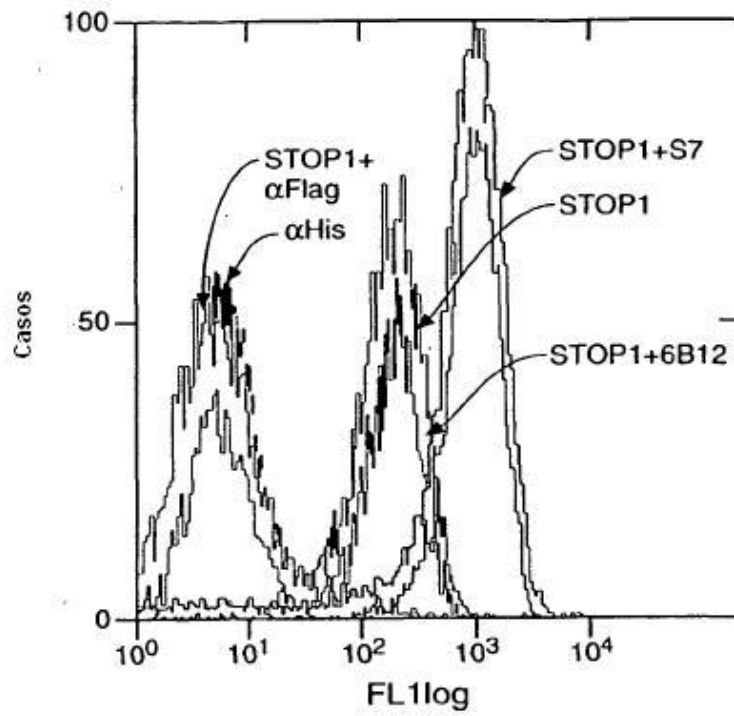


FIG._42

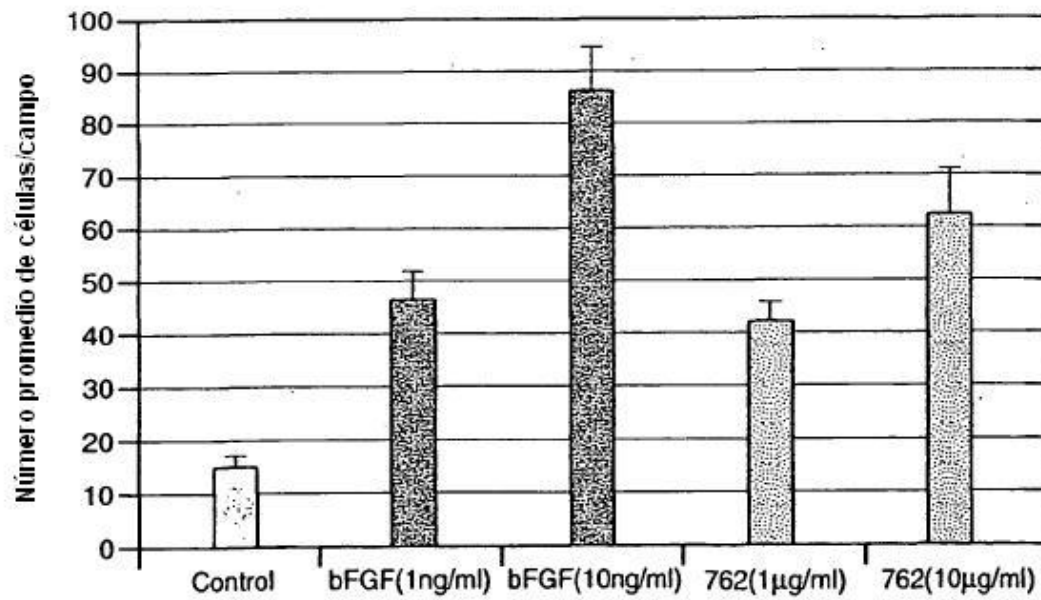


FIG._43

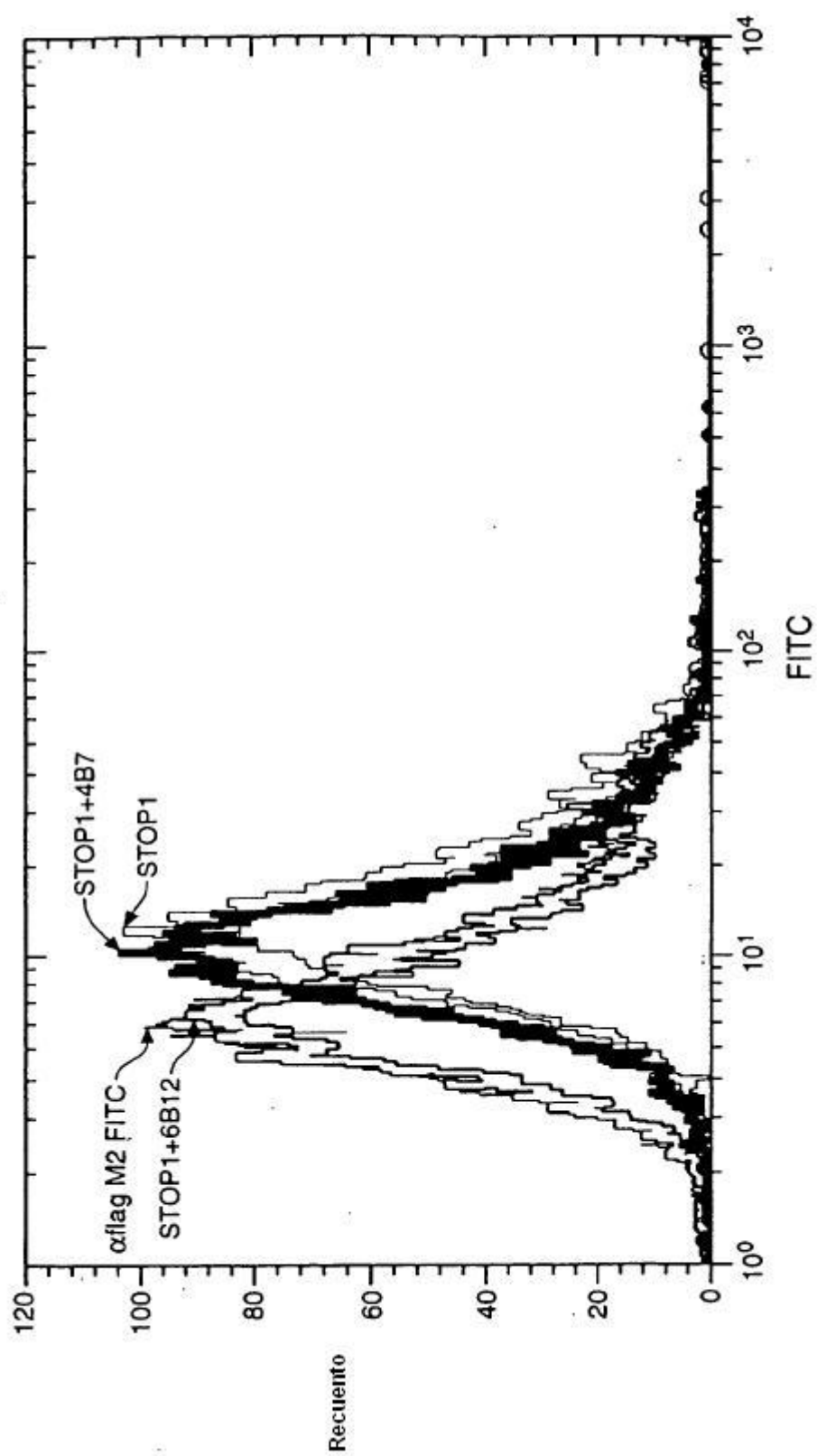


FIG._44

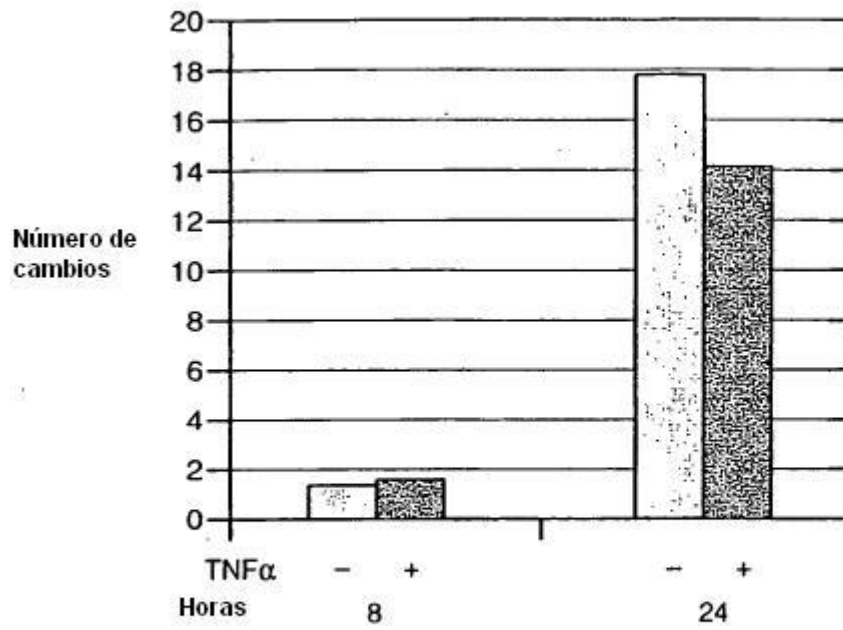


FIG. 45A

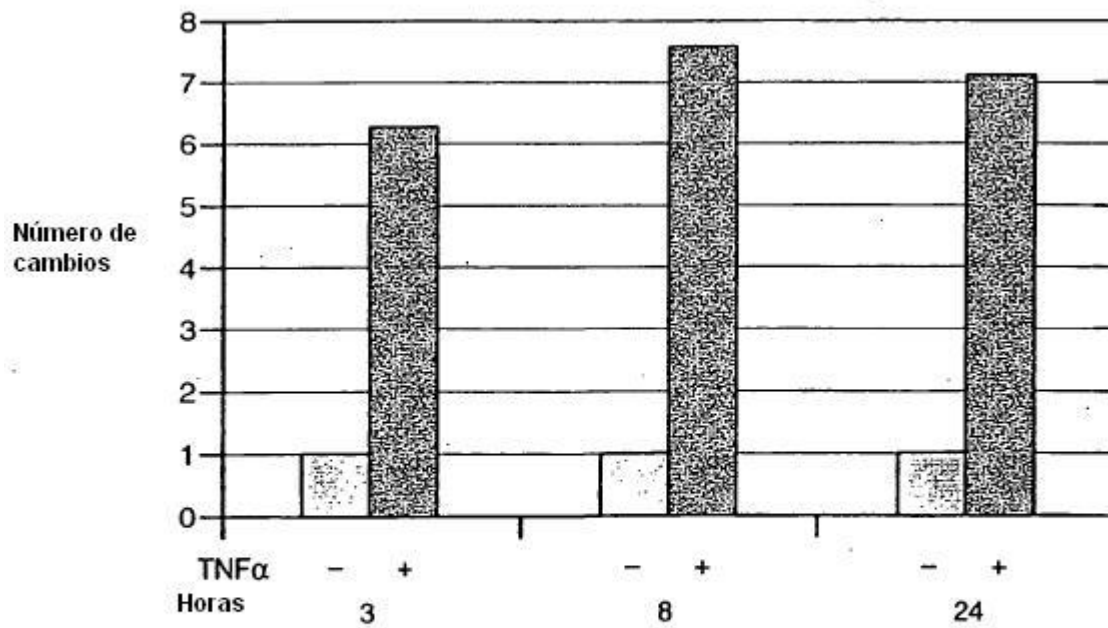


FIG. 45B