



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 642**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95933105 .9**

86 Fecha de presentación : **14.09.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0784684**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.1997**

54 Título: **Péptidos recombinantes derivados del anticuerpo Mc3 anti-BA46, métodos de uso de los mismos y métodos de humanización de péptidos de anticuerpos.**

30 Prioridad: **16.09.1994 US 307868**
07.06.1995 US 487598

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es:
Cancer Research Institute of Contra Costa
60 Gramercy Park North, Appt. 3B
New York, New York 10010, US

72 Inventor/es: **Do Couto, Fernando, J., R.;**
Ceriani, Roberto, I. y
Peterson, Jerry, A.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Péptidos recombinantes derivados del anticuerpo Mc3 anti-BA46, métodos de uso de los mismos y métodos de humanización de péptidos de anticuerpos.

Campo técnico

Esta invención se refiere al diagnóstico y a la terapia de tumores neoplásicos, particularmente carcinomas de mama humanos, así como al campo de la modificación de proteínas, particularmente, a la humanización de anticuerpos.

Antecedentes

La globulina de la grasa de leche materna (HMFG) puede ser usada como una fuente de material antigénico para la preparación tanto de anticuerpos policlonales como de monoclonales para su uso en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama, así como en el estudio de la superficie celular epitelial de mama y el tratamiento de sus componentes antigénicos.

La membrana de la globulina de grasa de leche se deriva a partir de la superficie apical de la célula epitelial mamaria durante la lactancia (Patton, S. *et al.* (1975) *Biochim Biophys Acta* **415**: 273-309). Por consiguiente, la HMFG, ha sido una fuente para el aislamiento de glicoproteínas de membrana de la mama (Taylor, P. J., *et al.* (1981) *Int J Cancer* **28**: 17-21). Usando la membrana de HMFG como un inmunógeno, fueron preparados antisueros policlonales demostrando que tenía especificidad para células epiteliales de mama después de la absorción con tejido no mamario. Estos antisueros policlonales se unieron específicamente a tres glicoproteínas con pesos moleculares de 150, 70, y 46 kDa, respectivamente (Ceriani, R. L., *et al.* (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 582-6).

Se han usado anticuerpos monoclonales contra HMFG en la identificación de un nuevo componente de la superficie de células epiteliales de mama, una glicoproteína tipo mucina de gran peso molecular, que fue llamada glicoproteína no penetrante o NPGP (Peterson, J. A., *et al.* (1990) *Hybridoma* **9**: 221-35; y Ceriani, R. L., *et al.* (1983) *Somatic Cell Genet* **9**: 415-27). Esta molécula ha sido usada como molécula objetivo en la radioinmunoterapia del cáncer de mama (Kramer, E. L., *et al.* (1993) *J Nucl Med* **34**: 1067-74; y Ceriani, R. L., *et al.* (1988) *Cancer Res* **48**: 4664-72), en el desarrollo de un ensayo del suero para el diagnóstico del cáncer de mama (Ceriani, R. L., *et al.* (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 54204; y Ceriani, R. L., *et al.* (1992) *Anal Biochem* **201**: 178-84), y en el pronóstico del cáncer de mama usando inmunohistoquímica (Ceriani, R. L., *et al.* (1992) *Int J Cancer* **51**: 343-54). Esta glicoproteína no penetrante (NPGP) parece ser extremadamente antigénica en ratones. La enorme mayoría de anticuerpos monoclonales preparados contra HMFG así como tumores de mama han sido encontrados que tienen especificidad contra los diferentes epítomos de esta mucina.

Sin embargo, las proteínas de peso molecular más pequeño de HMFG también parece que son importantes marcadores superficiales para las células epiteliales de la mama. También se encuentran antígenos de HMFG de 46 kDa y 70 kDa en el suero de pacientes con cáncer de mama y así pueden ser usados como marcadores para el cáncer de mama en los ensayos de suero. Además, el componente de 70 kDa se ha encontrado que se co-purifica con el complejo de NPGP intacto y se ha demostrado que se une a NPGP mediante puentes disulfuro.

Pocos anticuerpos monoclonales, sin embargo, han sido preparados contra los componentes más pequeños del sistema de globulina de grasa de leche materna, tales como los antígenos de HMFG de 70 kDa y 46 kDa. Aunque, Peterson, J. A., *et al.* (1990) *Hybridoma* **9**: 221-35 fueron capaces de generar un grupo de anticuerpos monoclonales contra HMFG que detectaba realmente el antígeno de HMFG de 46 kDa, incluyendo el anticuerpo Mc3. El componente de 46 kDa del sistema HMFG, también conocido como BA46, se ha encontrado que está presente en el suero de pacientes con cáncer de mama (Salinas, F. A., *et al.* (1987) *Cancer Res* **47**: 907-13), y fue encontrado que un aumento del BA46 circulante estaba asociado a una mayor carga de tumor. Además, BA46 ha sido una molécula objetivo en radioinmunoterapia experimental de tumores de mama humanos trasplantados en ratones desnudos (Ceriani, R. L. *et al.* (1988) *Cancer Res* **48**: 4664-72).

En algunas carcinomas de mama, hay una sobreexpresión del antígeno BA46 (Larocca, D., *et al.* (1991) *Cancer Res* **51**: 4994-8). También, en BA46 de leche materna parece haber una actividad anti-rotavirus que puede implicar la unión al rotavirus (Yolken, R. H., *et al.* (1992) *J Clin Invest* **90**: 1984-91) y esto puede interferir con las infecciones virales en recién nacidos.

Una secuencia del cADN parcial de BA46 ha sido previamente publicada (Larocca, D., *et al.* (1991) *Cancer Res* **51**: 4994-8) que colocó a BA46 en una familia de proteínas que poseen dominios del tipo C1/C2 de factores V/VIII relacionados con la discoidina I (Johnson, J. D., *et al.* (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5677-81). Las moléculas más relacionadas con BA46 pueden ser encontradas entre MGF-E8 murino (Stubbs, J. D., *et al.* (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8417-21), los componentes proteicos 15/16 bovinos (Mather, I. H., *et al.* (1993) *Biochem Mol Biol Int* **29**: 545-54) y GP55 de conejillo de indias (Mather, I. H., *et al.* (1993) *Biochem Mol Biol Int* **29**: 545-54).

Los estudios de clonación de cADN y de adhesión celular *in vitro* proporcionan pruebas de que BA46 es una glicoproteína de membrana de células epiteliales de mama implicadas en interacciones intercelulares. BA46 se localiza en la fracción de membrana cuando se aísla a partir de células de carcinoma de mama (Larocca, D., *et al.* (1991) *Cancer*

Res 51: 4994-8). Lo más probablemente es que BA46 interactúa con las integrinas de membrana vía su dominio tipo EGF que contiene RGD.

Las carcinomas son el resultado de la transformación cancerígena de células de epitelios diferentes. Dos de las características más perjudiciales de los carcinomas son su crecimiento incontrolado y su capacidad de crear la metástasis en sitios distantes del huésped, particularmente del huésped humano. Es, por lo general, la metástasis distante la que causa serias consecuencias al huésped, dado que con frecuencia el carcinoma primario por lo general puede ser eliminado con cirugía. El tratamiento de carcinomas metastásicos, que son raras veces eliminables, depende de la terapia de irradiación y de terapias sistémicas de diferentes naturalezas. Las terapias sistémicas actualmente incluyen quimioterapia, radiación, terapia hormonal, agentes farmacéuticos que aumentan la inmunidad y procedimientos, hipertermia y tratamiento sistémico con anticuerpos monoclonales. En el último caso, se pueden marcar las proteínas del anticuerpo con elementos radiactivos, inmunotoxinas y fármacos quimioterapéuticos.

Los anticuerpos monoclonales marcados radiactivamente fueron usados inicialmente con éxito en los linfomas y la leucemia, y recientemente en algunos carcinomas. El concepto, que es la base del uso de los anticuerpos marcados, es que el anticuerpo marcado buscará y se unirá específicamente al carcinoma y el elemento radiactivo irradiará al tumor *in situ*. Ya que las partículas descargadas durante la desintegración radiactiva viajan alguna distancia a través de los tumores no es necesario que cada célula del carcinoma se una el anticuerpo marcado. La especificidad de los anticuerpos monoclonales permite el tratamiento selectivo del tumor evitando la irradiación de los tejidos benignos. El uso de agentes de radiación sistémica y quimioterapéuticos sin agentes de reconocimiento produce serios efectos secundarios tóxicos en tejidos normales, no malignos, haciendo estas terapias indeseables para los carcinomas y el uso de anticuerpos monoclonales radiomarcados una alternativa válida.

Se han usado anticuerpos generados contra epítomos humanos para el diagnóstico y la terapia de carcinomas. También se conocen métodos para preparar tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Los ejemplos de éstos son BrE-2, BrE-3 y KC-4 (por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N^{os} 5.077.220; 5.075.219 y 4.708.930).

Compendio de la invención

La presente invención proporciona péptidos recombinantes que se unen específicamente y selectivamente al antígeno BA46 de la globulina de grasa de leche materna (HMFG). En particular, la presente invención proporciona variantes recombinantes del anticuerpo Mc3, incluyendo versiones humanizadas de Mc3. Los péptidos de la variante Mc3 son particularmente útiles para el diagnóstico, pronóstico y aplicaciones terapéuticas en el campo del cáncer de mama.

Los anticuerpos de Mc3 humanizados que conservan la capacidad de asociarse en una unión de alta afinidad a su antígeno cognado pueden ser producidos por nuevos métodos para la humanización de anticuerpos. Tal humanización permite el uso de estos anticuerpos para aplicaciones inmunodiagnósticas e inmunoterapéuticas en seres humanos.

Un número de realizaciones preferidas de la presente invención son enumeradas más abajo.

1. Un anticuerpo Mc3 recombinante que se une específicamente al antígeno BA46 de la globulina de grasa de leche materna (HMFG), comprendiendo dicho anticuerpo:

- (i) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de Mc3 murino mostrada en la Figura 12 o su variante en la que han sido humanizados al menos uno, pero menos de 30 restos de aminoácidos, y en la que los restos de aminoácidos dentro de las CDR, los restos de aminoácidos que se ponen en contacto con las CDR y los restos de aminoácidos que se ponen en contacto con una cadena opuesta del anticuerpo son restos de aminoácidos murinos; y
- (ii) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de Mc3 murino mostrada en la Figura 13 o su variante en la que han sido humanizados al menos uno, pero menos de 30 restos de aminoácidos, y en la que los restos de aminoácidos dentro de las CDR, los restos de aminoácidos que se ponen en contacto con las CDR y los restos de aminoácidos que se pone en contacto con una cadena opuesta del anticuerpo, son restos de aminoácidos murinos;

y en el que, al menos un resto de aminoácido oculto dentro de la región de la variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera ha sido humanizado.

Preferiblemente, hay entre aproximadamente 3 y 25 restos de aminoácidos humanizados, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y 20, todavía más preferiblemente entre aproximadamente 7 y 17. Las regiones variables son humanizadas de acuerdo con la técnica de modificación del resto oculto, como se describe más abajo. Preferiblemente, todas las variantes de Mc3 de la presente invención conservan un nivel de avidéz que es al menos aproximadamente el 20% de él del anticuerpo de partida (es decir, el Mc3 murino), más preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%. El término "recombinante" se refiere al hecho de que los anticuerpos de la presente invención no son naturales y son los productos de las técnicas recombinantes.

2. Un anticuerpo de Mc3 murino recombinante de acuerdo con la realización 1, en el que al menos uno de dichos aminoácidos humanizados es sustituido por el aminoácido correspondiente a partir de la secuencia consenso humana apropiada de la figura 12 ó 13, para una región variable de cadena pesada o ligera, respectivamente. También pueden usarse restos humanos no consenso aunque comúnmente observados, pero los restos consenso son los más preferidos.
3. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con la realización 1 ó 2, en el que ambas regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera son variantes de las secuencias de aminoácidos de Mc3 murino, como se define en la reivindicación 1.
4. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con la realización 3, en el que el anticuerpo comprende además una región constante de anticuerpo u otro agente efector. Cualquiera de una variedad de agentes efectores puede ser unida a los anticuerpos de la presente invención, como se describe más abajo. Por ejemplo, el agente efector puede ser una citoquina, enzima, toxina, radioisótopo o marcador fluorescente.
5. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con la realización 4, en el que la región constante es una región constante de anticuerpo humano.
6. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que al menos cinco de los restos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada o de cadena ligera han sido sustituidos con los aminoácidos correspondientes de la secuencia consenso humana apropiada de la Figura 12 ó 13 para una región variable de cadena pesada o de cadena ligera, respectivamente.
7. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que en la región variable de cadena pesada al menos la mitad de los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) en la Figura 12 han sido sustituidos con restos correspondientes de la secuencia consenso humana de la Figura 12.
8. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que en la región variable de cadena ligera al menos la mitad de los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) en la Figura 13 han sido sustituidos con restos correspondientes de la secuencia consenso humana de la Figura 13.
9. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con la realización 5, en el que en la región variable de cadena pesada al menos el 90% de los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) en la Figura 12 han sido sustituidos con restos correspondientes de la secuencia consenso humana de la Figura 12; y en la región variable de cadena ligera al menos el 90% de los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) en la Figura 13 han sido sustituidos con restos correspondientes de la secuencia consenso humana de la Figura 13.
10. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con la realización 9, en el que todos los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) han sido sustituidos con restos correspondientes de las secuencias consenso humanas de la Figura 12 ó 13, para las cadenas pesada y ligera, respectivamente.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publ., Easton, PA.
12. Un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada o ligera variante como se define en la realización 1, en el que ha sido humanizado al menos un resto aminoácido oculto.
13. Una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la realización 12 que comprende la región codificante de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 18 ó 19. Las regiones codificantes son las mostradas en mayúsculas.
14. Un método para detectar la presencia de un antígeno de HMFG *in vitro* o su fragmento de unión, que comprende:
proporcionar una muestra biológica sospechada de comprender el antígeno o su fragmento,
añadir a la muestra un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 10 en condiciones eficaces para formar un complejo anticuerpo-antígeno; y
detectar la presencia de cualquier complejo anticuerpo-antígeno formado.
15. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 10 para el uso en un método para diagnosticar la presencia de un antígeno de HMFG o su fragmento de unión en un sujeto que comprende:
administrar al sujeto dicho anticuerpo bajo condiciones eficaces para suministrarlo a una zona del cuerpo del sujeto sospechada de contener un antígeno de HMFG o su fragmento de unión para formar un complejo anticuerpo-antígeno; y
detectar la presencia de dicho complejo antígeno-antígeno.

16. Un anticuerpo de Mc3 recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 10 para uso en un método para suministrar un agente a un sitio objetivo que contiene un antígeno de HMFG que comprende:

unir dicho agente a dicho anticuerpo en una posición distinta a la del sitio de unión del antígeno para crear un complejo agente-anticuerpo; e

introducir el complejo agente-anticuerpo al ambiente de dicho sitio objetivo en condiciones adecuadas para unir un anticuerpo a su antígeno cognado.

17. Un anticuerpo de acuerdo con la realización 16, en el que el sitio objetivo está dentro del cuerpo de un sujeto humano y en el que la introducción de un complejo agente-anticuerpo comprende administrar el complejo a dicho sujeto

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra estructuras Fab para las cuales las coordenadas están disponibles en el banco de datos para proteínas.

Las Figuras 2 y 3 ilustran los restos marco V_L y V_H , respectivamente, que se ponen en contacto con restos de CDR en Fab de estructuras tridimensionales conocidas.

La Figura 4 ilustra los restos marco que se ponen en contacto con restos marco en el dominio opuesto en Fab de estructuras tridimensionales conocidas.

Las Figuras 5 y 6 ilustran restos marco ocultos en las regiones V_L y V_H , respectivamente, de Fab de estructuras tridimensionales conocidas.

La Figura 7 ilustra los anticuerpos humanos que son los más similares en la secuencia respecto a los anticuerpos murinos de estructura tridimensional conocida.

Las Figuras 8 (SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:18) y 9 (SEQ ID NO:19 a SEQ ID NO:45) ilustran restos marco en V_L y V_H , respectivamente, los que probablemente tienen que ser conservado para reproducir las propiedades de unión de ligando del anticuerpo original.

Las Figuras 10 (SEQ ID NO:46 y SEQ ID NO:47) y 11 (SEQ ID NO:48 y SEQ ID NO:49) ilustran las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos correspondientes de las regiones V_L y V_H , respectivamente, de Mc3 y sus péptidos líder respectivos. Se muestran nucleótidos y aminoácidos con los códigos de letras estándar. Los aminoácidos en minúscula representan los péptidos líder. Los nucleótidos en minúscula representan sobrelapamientos de la secuencia del cebador y, por lo tanto, no corresponden a las secuencias naturales.

Las Figuras 12 y 13 ilustran el protocolo de humanización (técnica de “modificación del resto oculto”) usado para modificar las regiones V_L y V_H , respectivamente, del anticuerpo de Mc3.

Las Figuras 14 (SEQ ID NO:47) y 15 (SEQ ID NO:49) ilustran las secuencias de aminoácidos de las regiones V_L y V_H del anticuerpo de Mc3, respectivamente, humanizado de acuerdo con la técnica “retención del resto oculto”.

Las Figuras 16 (SEQ ID NO:50 a SEQ ID NO:55) y 17 (SEQ ID NO:56 a SEQ ID NO:49) ilustran los cebadores usados en la construcción de los genes que codifican el anticuerpo de Mc3 humanizado (HuMc3).

Las Figuras 18 (SEQ ID NO:62 y SEQ ID NO:63) y 19 (SEQ ID NO:64 y SEQ ID NO:65) ilustran las secuencias de nucleótidos y proteínas derivadas de las regiones V_L y V_H , respectivamente, de HuMc3v2.

La Figura 20 ilustra los resultados del ensayo competitivo entre MuMc3 (anticuerpo Mc3 murino tipo silvestre) o HuMc3 (anticuerpo Mc3 humanizado) y ^{125}I -MuMc3.

La Figura 21 ilustra los resultados de estudios de biodistribución en ratones desnudos que llevaban el tumor de mama transplantable MX-1 humano, mostrando la posición de IgGcontrol ^{125}I -marcada, MuMc3, y HuMc3 a los 1, 2, 4 y 8 días después de la inyección.

La Figura 22 ilustra los resultados de estudios de radioinmunoterapia en ratones que llevaban el tumor MX-1. HuMc3 ^{125}I -marcado contuvo o redujo la masa tumoral en animales tratados, mientras que el tumor en animales no tratados creció ~20 veces respecto al tamaño original.

La Figura 23 ilustra los resultados de estudios de biodistribución en ratones que llevaban el tumor MX-1, en el que MuMc3 y HuMc3 fueron radiomarcados con ^{111}In usando el quelante MXDTPA.

Descripción detallada de la invención

El anticuerpo Mc3 ofrece considerables esperanzas por su uso en la inmunodetección y la inmunoterapia del cáncer de mama. Se sabe que Mc3 se une al antígeno BA-46 en la globulina de grasa de leche materna. Véase, R. Ceriani *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**:5420-5424 (1982); R. Ceriani *et al.*, *Somatic Cell Genetics* **9**:415-427 (1983); R. Ceriani y E. Blank, *Cancer Res.* **48**:4664-4672 (1988); y J. Peterson *et al.*, *Hybridoma* **9**:221-235 (1990). Véase también la publicación internacional WO92/07939, publicada el 14 de mayo de 1992, por Ceriani y Peterson (describiendo el antígeno BA-46).

Las variantes recombinantes del anticuerpo monoclonal Mc3 serían especialmente útiles para proporcionar una variedad de agentes inmunodiagnósticos e inmunoterapéuticos relacionados con Mc3. Una clase particularmente deseable de tales variantes son los derivados de Mc3 "humanizados" que conservan la capacidad de interactuar con el antígeno de HMFG BA-46 con alta especificidad y avidéz; pero que exhiben menor inmunogenicidad en seres humanos. Sin embargo, sin conocer las secuencias de aminoácidos de las cadenas del anticuerpo Mc3 (en particular sus regiones variables) y sin tener secuencias de ADN disponibles, no es factible desarrollar tales variantes.

Como se describe más abajo, los presentes inventores han clonado y han secuenciado las regiones críticas del anticuerpo Mc3, y han descrito ahora y han proporcionado una variedad de péptidos de la variante Mc3.

Además, como se describe más abajo, los presentes inventores han desarrollado una nueva técnica de humanización para preparar variantes de Mc3 en las cuales la tendencia para obtener una reacción de anticuerpo antirratón humano (HAMA) en seres humanos es drásticamente reducida o eliminada. La técnica ha causado la generación de una clase especialmente preferida de variantes de Mc3 humanizadas en las cuales restos de aminoácidos particulares en la región marco de la cadena variable han sido humanizados selectivamente. Se ha mostrado que estas variantes de Mc3 humanizadas permanecieron bastante eficaces en la unión a su antígeno cognado.

Preparación de péptidos recombinantes de Mc3

Los presentes inventores seleccionaron la estrategia siguiente para la preparación y la fabricación de los péptidos recombinantes e híbridos de esta invención. Los cADN que codifican las regiones variables del anticuerpo, V_L y V_H , de las cadenas pesada y ligera respectivamente pueden ser obtenidos mediante el aislamiento del mRNA a partir de una célula de hibridoma y la transcripción inversa del mRNA, amplificación del cADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la inserción del ADN en un vector para una secuenciación opcional, y para el recorte con la enzima de restricción. En general, tanto las regiones variables V_L como V_H se requiere que reproduzcan eficazmente las propiedades de unión de un anticuerpo. Hay dos clases estrechamente relacionadas de regiones V_L (dependiendo de si V_L se derivada de la cadena ligera kappa o lambda) y éstas además se subdividen por la convención en varias familias de secuencias (véase Kabat *et al.* 1991). Hay también varias familias de secuencia para V_H (id).

Los cADN de región variable entonces pueden ser modificados con cebadores prediseñados usados para amplificar por PCR o ser sintetizados de novo, clonados en un vector que opcionalmente lleve las secuencias de ADN que codifican, por ejemplo, la(s) región(ones) constante(s), opcionalmente secuenciada, y luego ser transfectados en una célula huésped para la expresión del producto génico recombinante. Las características de especificidad de unión de los péptidos recombinantes entonces pueden ser determinadas y comparadas con las de los anticuerpos aislados inicialmente.

Teniendo la secuencia disponible, se puede aplicar cualquiera de un número de técnicas para la producción de las variantes del anticuerpo Mc3 que conserven la unión del antígeno, pero que exhiban otras propiedades que los hagan más deseables para usos diagnósticos y/o terapéuticos particulares. Una clase especialmente preferida de tales variantes descritas en este documento son las variantes humanizadas en las cuales las regiones variables de las cadenas ligeras y/o pesadas han sido modificadas para hacerlas menos propensas a producir cualquier respuesta inmunogénica (HAMA) en seres humanos. Tales variantes son así más útiles para la administración *in vivo*. Aunque pueden ser utilizados varios protocolos de humanización diferentes, como se describe en este documento, los inventores han desarrollado una nueva técnica para la humanización de anticuerpos que es especialmente útil porque logra dos objetivos altamente deseables pero que son, con frecuencia, contrarios: (i) humanizar tantos restos como sea posible para reducir la probabilidad de inmunogenicidad; y (ii) conservar la avidéz del anticuerpo heterólogo original.

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro del conocimiento del experto de la técnica. Tales técnicas son explicadas totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch, y Maniatis, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Segunda Edición (1989), *OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS* (M. J. Gait Ed., 1984), *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, ed., 1987), la serie *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.); *GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS* (J. M. Miller y M. P. Calos Eds. 1987), *HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY*, (D. M. Weir y C. C. Blackwell, Eds.); *CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY*, (A. K. Abbas, A. H. Lichtman y J. S. Pober, 1991 y 1993); *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, y K. Struhl Ed. 1987 y 1993); y *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY* (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober Eds. 1991).

Todas las patentes, solicitudes de patente, y publicaciones mencionadas en este documento, tanto *supra* como *infra*, son incorporados por la presente en este documento como referencia.

Por vía de la ilustración tanto el uso potencial de los anticuerpos de la variante descritos en este documento, como la importancia de ampliar su utilidad vía la humanización, se puede considerar el uso de radioinmunoconjugados de tales anticuerpos tanto en aplicaciones diagnósticas como en terapéuticas. Como un ejemplo, se sabe que los anticuerpos de BrE-3 (Peterson *et al.* (1990) *Hybridoma* 9: 221; y la patente de EE.UU. N°. 5.075.219 de Ceriani y Peterson) se unen preferencialmente a tumores de carcinoma neoplásicos porque los tumores expresan una forma no glicosilada de la mucina epitelial de la mama que no se expresa en el tejido epitelial normal. Esta unión preferencial combinada con una baja concentración observada de epítipo para estos anticuerpos en la circulación de pacientes con carcinoma, tales como pacientes con cáncer de mama, hace de los anticuerpos, que tienen especificidad para un epítipo de mucina, una radioinmunoterapia del carcinoma potencialmente eficaz. Se provó que un radioinmunoconjugado de ⁹⁰Y-BrE-3 era altamente eficaz contra carcinomas de mama humanos trasplantados en ratones desnudos. Estudios clínicos en humanos mostraron que el radioinmunoconjugado de ⁹⁰Y-BrE-3 reducía bastante el tamaño de la metástasis del tumor de mama sin ningún efecto secundario tóxico inmediato. Además, fue usado satisfactoriamente un radioinmunoconjugado de ¹¹¹In-BrE-3 para visualizar el cáncer de mama en 15 pacientes, proporcionando un excelente reconocimiento del tumor en 13 de los 15 pacientes. De todas las metástasis de tumor de mama que aparecieron en otro estudio, el 86% fue detectado con ¹¹¹In-BrE-3. Lamentablemente, de 2 a 3 semanas después del tratamiento, los pacientes desarrollaron una fuerte respuesta del anticuerpo antimurino humano (HAMA) que previno de una administración posterior del radioinmunoconjugado. La respuesta de HAMA, que es observada para numerosos anticuerpos monoclonales murinos, excluye cualquier administración a largo plazo de anticuerpos murinos a pacientes humanos. Asimismo, otros anticuerpos heterólogos, cuando se administran a seres humanos, proporcionaron respuestas inmunes similares. La respuesta antiheteróloga humana es así un factor sustancial que limita el uso con éxito de anticuerpos monoclonales heterólogos como agentes terapéuticos.

Humanización del anticuerpo

Basado en los estudios descritos anteriormente y otros, es evidente que en muchos casos los anticuerpos monoclonales sólo pueden ser administrados una vez a un sujeto debido a los efectos perjudiciales por proporcionar una respuesta inmunogénica. Esto es verdadero para la mayor parte de los anticuerpos heterólogos que se administran a animales mamíferos.

Varias tentativas diferentes han sido hechas en un esfuerzo de evitar estos problemas, incluyendo el desarrollo de los denominados "anticuerpos quiméricos" y "anticuerpos CDR-injertados", e intentan generar líneas de hibridoma monoclonal humanas. Estos esfuerzos se han encontrado con un éxito sólo limitado. Los "anticuerpos quiméricos" son fusiones directas entre los dominios variables de una especie y los dominios constantes de otra. Se ha demostrado que los anticuerpos quiméricos murino/humano son menos inmunogénicos en seres humanos que los anticuerpos murinos enteros, pero, sin embargo, en algunos casos una respuesta inmune es montada en la región variable murina. Una reducción más de la naturaleza "extraña" o heteróloga de los anticuerpos fue alcanzada "injertando" sólo las CDR, a partir de un anticuerpo monoclonal murino en un marco de soporte humano (es decir, la región marco "FR") antes de su fusión subsecuente con un dominio constante apropiado, (solicitud de patente europea, publicación N°. 239,400 de Winter; Riechmann, *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-327). Sin embargo, los procedimientos empleados para lograr los injertos de CDR pueden proporcionar anticuerpos "humanizados" que no son tan eficaces en la unión al antígeno. Es decir, los anticuerpos CDR-injertados resultantes tienden a perder la avidez (en muchos casos a menos de un tercio de la avidez original). El tercer tipo de técnica, el uso de líneas de hibridoma monoclonales humanas tampoco ha sido satisfactorio en general. En particular, las líneas celulares de hibridoma monoclonales humanas no son muy estables y, por lo tanto, no han sido adecuadas para la producción repetida a gran escala de anticuerpos monoclonales.

Una técnica mejor para la humanización de anticuerpos monoclonales es descrita en la publicación internacional WO94/11509, publicada el 26 de mayo de 1994, por Couto *et al.* Esta técnica, denominada en este documento la "técnica de retención del resto oculto" o la "técnica BR-R", también se describe más abajo.

Una técnica mucho mejor para la humanización de anticuerpos monoclonales es descrita en este documento. Usando esta nueva técnica, denominada la "técnica de modificación del resto oculto" o la "técnica BR-M", los inventores han producido péptidos de Mc3 humanizados, como se describe más abajo. Sorprendentemente, aunque la técnica de modificación del resto oculto implicaba la humanización de incluso más restos que la técnica de BR-R antes descrita, y que por eso se esperaba además reducir la posibilidad de obtener una respuesta HAMA en seres humanos, se ha demostrado que la variante del anticuerpo Mc3 humanizado conservaba sustancialmente toda la avidez del anticuerpo murino original. Una descripción de estas técnicas y aplicaciones ilustrativas es proporcionada más abajo.

Como un asunto general, las características de unión del ligando de un sitio de combinación del anticuerpo se determinan principalmente por la estructura y la disposición relativa de las CDR, aunque algunos restos vecinos también hayan sido encontrados que estaban implicados en la unión del antígeno (Davies, *et al.* (1990) *Ann. Rev. Biochem.* 59: 439-473). Los derivados humanizados de anticuerpos no humanos se basan en grados variables bajo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) para proporcionar la afinidad de unión al ligando del anticuerpo, y los restos marco (FR) que soportan las CDR para dictar su disposición relativa entre sí. El análisis cristalográfico de numerosas estructuras de anticuerpo ha revelado que el sitio de unión antígeno/anticuerpo está compuesto casi completamente de los restos de CDR. La necesidad de las CDR para formar estas estructuras, combinado con la

hipervariabilidad apreciada de su secuencia primaria, conduce a una gran diversidad en el sitio de combinación del antígeno.

Los estudios cristallográficos de rayos X muestran que las estructuras de marco del F_v de anticuerpos diferentes asumen una estructura canónica independientemente de la especie de origen, la secuencia de aminoácidos, o la especificidad del ligando. Esto generalmente es tomado como prueba de que las características de unión de ligando de un sitio de combinación de anticuerpo son determinadas principalmente por la estructura y la disposición relativa de las CDR, aunque algunos restos marco vecinos también puedan estar implicados en la unión del antígeno. Así, si la especificidad exacta de un anticuerpo debe ser conservada, sus estructuras CDR, y probablemente algunos restos vecinos, su interacción con cada uno y con el resto de los dominios variables, también deben ser mantenidas. Estos estudios cristallográficos indican la posible necesidad de conservar la mayor parte, si no todos, de estos restos.

Aunque al principio la necesidad de conservar estos aminoácidos podría parecer que previene el logro del objetivo de inmunogenicidad decreciente por la “humanización”, el número real de aminoácidos que deben ser conservados es, por lo general, relativamente pequeño debido a la asombrosa semejanza entre, por ejemplo, regiones variables humanas y murinas.

El uso tanto de la técnica de retención del resto oculto (“BR-R”) como de la técnica de modificación del resto oculto (“BR-M”), la humanización de la región variable de un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo murino, comienza con la identificación de aminoácidos xenogéneos “importantes” que se conservan. Tanto en la técnica BR-R como en la técnica BR-M, los restos de aminoácidos que están implicados en la unión del antígeno, o que se ponen en contacto con las CDR y/o una cadena opuesta del anticuerpo son asignados a la categoría de restos “importantes” que quedan en su forma original, por ejemplo, en forma murina.

Los dos métodos se diferencian sorprendentemente, sin embargo, en lo que concierne a su tratamiento de restos de aminoácidos ocultos, es decir, aquellos que tienen cadenas laterales que no están expuestas en la superficie de la molécula. En particular, la técnica BR-R estaba basada en parte en las dos proposiciones siguientes: (i) no se podría esperar que los restos de aminoácidos ocultos contribuyeran sustancialmente a la antigenicidad del anticuerpo (por ejemplo, la respuesta HAMA obtenida por un anticuerpo monoclonal murino); y (ii) variando tales restos ocultos se podría afectar a la estructura subyacente de la cadena del anticuerpo, disminuyendo o destruyendo así la avidez original para la cual fue seleccionado. En consecuencia, en la técnica BR-R, estos restos ocultos no son modificados de su forma original. Así, por ejemplo, aplicando la técnica BR-R a la humanización de un anticuerpo murino, los restos ocultos serían dejados como ellos estaban en la forma murina original. Entonces, entre los restos expuestos, aquellos restos que constituyen las CDR, y aquellos restos marco que se ponen en contacto con las CDR y/u otra cadena, serían conservados. Los otros restos expuestos serían preferiblemente humanizados.

El método BR-M implica tomar la decisión opuesta en lo que concierne a los restos ocultos. Es decir, más que conservar los restos ocultos en su forma original (por ejemplo, en la forma murina), son humanizados preferiblemente por el reemplazo con los aminoácidos correspondientes a aquellos en un modelo consenso humano. El método BR-M fue empleado en este documento en la producción de anticuerpos humanizados preferidos derivados de Mc3. De improviso, esta humanización adicional (que además debía reducir la posibilidad de una respuesta HAMA en seres humanos) no bloqueó la capacidad de las CDR de unirse al antígeno cognado. Al contrario, como se ilustra más abajo, los anticuerpos de Mc3 humanizados producidos por el método BR-M exhibieron una alta avidez de unión específica a BA46 que fue totalmente comparable con la del anticuerpo murino original.

Aunque los restos ocultos han sido considerados como que contribuyen probablemente poco a la inmunogenicidad, los presentes inventores creen que tales restos pueden de hecho influir en la inmunogenicidad, aunque la manera en la cual ellos lo hacen pueda ser indirecta. En particular, incluso si un resto es relativamente inaccesible al disolvente, éste sin embargo puede ejercer un efecto de “empuje” o “extracción” sobre los restos superficiales cercanos. En otras palabras, aunque los restos ocultos no contribuyan a la estructura primaria de la superficie del anticuerpo, ellos bien pueden afectar a su forma. Ya que esta forma a su vez puede influir en la inmunogenicidad, los presentes inventores han emprendido la modificación de restos ocultos en un esfuerzo para crear un anticuerpo más “humano”. Usando la técnica BR-M de los inventores, se ha logrado alcanzar con éxito tal humanización sin sacrificar la avidez del anticuerpo heterólogo.

La humanización de un resto particular es lograda modificando aquel resto que se parezca a un resto encontrado en la posición correspondiente en un “modelo consenso humano”. El modelo consenso humano es determinado por la comparación de una variedad de anticuerpos humanos como se ilustra más abajo.

Pueden ser identificados restos importantes a partir de una estructura tridimensional bien caracterizada. Sin embargo, cuando no están disponibles los datos estructurales directos, es posible usar la presente metodología para predecir la posición de restos marco importantes analizando otras estructuras de anticuerpo relacionadas, especialmente aquellas cuyas regiones variables ligeras y pesadas pertenecen a la misma clase. Las clases de regiones variables pueden ser determinadas a partir de sus secuencias de aminoácidos.

Un método por el cual estos aminoácidos importantes son identificados ha sido descrito para el caso de los aminoácidos con cadenas laterales ocultas por Padlan, E. A. (Padlan, E. A., “A Possible Procedure for Reducing the Immunogenicity of Antibody Variable Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties”, *Molecular Im-*

munology, **28**:489-494 (1991)). Las estructuras de la región variable de varios anticuerpos fueron comparadas usando un programa informático que determina la accesibilidad del disolvente de los restos marco así como sus contactos con el dominio opuesto como se describe en Padlan, E. A. (1991), *supra*. El examen de tal accesibilidad del disolvente fraccionaria revela una semejanza muy cercana en el modelo de exposición de los dominios V_H y V_L . Puesto en términos simples, independientemente del anticuerpo particular en cuestión, y de su secuencia de aminoácidos, los restos ocultos ocupan posiciones relativas similares en la mayor parte de los anticuerpos.

Un análisis similar puede ser hecho con modelado por ordenador, para determinar qué aminoácidos se ponen en contacto con las CDR y cuáles se ponen en contacto con el dominio opuesto. En este punto, las estructuras de Fab que están actualmente en el banco de datos de proteínas (Bernstein, F. C., *et al.*, *J. Mol. Biol.* **112**:535-542 (1977)) pueden ser examinadas para determinar qué FR son probablemente importantes en el mantenimiento de la estructura del sitio de combinación. Así, después de una inspección profunda de muchas estructuras tridimensionales de alta resolución de regiones variables, las posiciones de todos los aminoácidos marco importantes, es decir, de aquellos que se ponen en contacto con las CDR, y el dominio opuesto, pueden ser tabuladas. Conservando estos aminoácidos, así como aquellos de las CDR, y finalmente aquellos aminoácidos de FR que puedan estar implicados en la unión del ligando, se asegura en mayor grado la preservación de la afinidad. La identificación exacta de los aminoácidos de FR que están implicados en la unión del ligando no puede ser generalizada ya que esto varía para los diferentes anticuerpos. Sin embargo, pueden hacerse decisiones conservadoras para preservar los aminoácidos localizados en FR que tienen una alta probabilidad de ponerse en contacto con el antígeno. Muchos de estos restos están localizados adyacentes a las CDR y en el extremo N-terminal de ambas cadenas, porque las superficies de estas regiones tienden a ser contiguas con las superficies de CDR.

Como se describe en este documento, es, de hecho, posible conservar todos estos aminoácidos importantes en su forma original (heteróloga), por ejemplo como estaban en un anticuerpo monoclonal murino, y aún producir su versión humanizada que imite sustancialmente a un anticuerpo humano y así obtener con menor probabilidad una respuesta HAMA.

Todos los aminoácidos que se determinan que no son importantes por el método BR-R o BR-M pueden ser sustituidos por sus parejas humanas correspondientes, preferiblemente seleccionados a partir de una secuencia consenso humana como se ilustra más abajo.

Diseño de un marco preferido para uso en la humanización de un anticuerpo

Hay al menos 11 estructuras Fab, 2 de anticuerpos humanos y 9 de murinos, para los cuales se conocen las coordenadas atómicas y que están disponibles en el banco de datos de proteínas. Estos anticuerpos, catalogados en la Figura 1, han sido usados para desarrollar un "consenso posicional" de las clases importantes de restos marco, como se describe más abajo.

En una primera categoría, ciertos contactos entre cadenas laterales en los dominios variables de los 11 Fab han sido recogidos y presentados en las Figuras de 2 a 4. Los números mostrados entre paréntesis después de cada resto corresponden al número de contactos atómicos en los cuales el resto está implicado. Sólo los contactos que implican átomos de la cadena lateral son presentados; y los átomos son designados como que están en contacto si están dentro de la suma de sus radios de van der Waals (Case y Karplus, *J. Mol. Biol.* **132**:343-368, 1979) más 0,5 ángstroms. El esquema de enumeración en todas partes es el de Kabat *et al.* ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª ed. del Departamento de los EE.UU de Salud y Servicios Humanos, Publicación NIH N° 91-3242 (1991)).

La Figura 2 ilustra restos marco en los dominios V_L que, según se piensa, se ponen en contacto con las CDR. Los restos marco en los dominios V_H que, según se piensa, se ponen en contacto con las CDR son mostrados en la Figura 3. Los restos marco que, según se piensa, se ponen en contacto con la cadena opuesta (que, por lo visto, mantienen la estructura cuaternaria de los dominios variables) son mostrados en la Figura 4.

En una segunda categoría, son examinados los restos que señalan hacia adentro y los ocultos. Un resto que señala hacia adentro es designado como oculto si al menos el 50% de su cadena lateral es inaccesible para el disolvente. Las accesibilidades de los disolventes pueden ser calculadas usando el programa de M. L. Connolly (*J. Appl. Crystallogr.* **16**, 548-558) y las rutinas desarrolladas por S. Sheriff *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:1104-1107), como se describe en Padlan (*Proteins: Struct. Funct. Genet.* **7**:112-124, 1990); la exposición del resto es definida en el contexto de un dominio aislado. Los restos ocultos en los dominios V_L , es decir, los que están localizados en el interior del dominio, son mostrados en la Figura 5. Los restos ocultos en el dominio V_H son catalogados en la Figura 6.

Un consenso posicional "conservador" (los que se utilizan típicamente) consideraría una posición como importante incluso si sólo uno o algunos de los anticuerpos examinados tuvieran restos importantes en aquella posición. Por vía de la ilustración, puede ser visto en la Figura 6 que muchas de las posiciones de los restos ocultos en las regiones V_H fueron conservadas a través de la mayor parte o de todos los anticuerpos probados. Sin embargo, la posición 9 fue ocupada por un resto oculto en sólo un caso (un resto de prolina en el anticuerpo HyHEL-10). Bajo un enfoque algo menos conservador, se podrían excluir tales posiciones que sólo raras veces estaban ocupadas por un resto importante.

La secuencia consenso posicional de restos importantes variará dependiendo de si los restos ocultos son considerados como "importantes" o no (es decir, si se usa la técnica BR-R o la técnica BR-M).

Aplicando esta metodología, se obtiene el consenso posicional conservador siguiente para la humanización de una región V_L usando la técnica BR-R:

1-7, 11, 13, 19, 21-23, 35-38, 43-49, 58, 60-62, 66, 67, 69-71, 73, 75, 78, 82-88, 98, 100, 102, 104 y 106.

Un consenso posicional de BR-R correspondiente para una región V_H es como sigue:

1, 2, 4, 6, 9, 12, 18, 20, 22, 24, 27-30, 36-40, 43-49, 66-69, 71, 73, 76, 78, 80, 82, 82c, 86, 88, 90-94, 103, 105, 107, 109 y 111.

Para la aplicación de la técnica BR-M, un consenso posicional conservador para una región V_L es como sigue:

1-5, 7, 22, 23, 35, 36, 38, 43-46, 48, 49, 58, 60, 62, 66, 67, 69, 70, 71, 85, 87, 88, 98 y 100.

Un consenso posicional de BR-M correspondiente para una región V_H es como sigue:

1, 2, 4, 24, 27-30, 36-40, 43-49, 66-69, 71, 73, 78, 80, 82, 86, 91-94, 103 y 105.

Estas secuencias consenso posicionales pueden ser usadas como convenientes “plantillas” para predecir la presencia de un resto importante en un anticuerpo que se humaniza, como se ilustra más abajo. Las secuencias consenso posicionales se aplican sólo a los restos marco. (En las realizaciones preferidas, los restos de CDR siempre son considerados importantes y por lo tanto son preferiblemente conservados. Es posible, sin embargo, modificar uno o varios de estos restos de CDR sin afectar sustancialmente la unión del antígeno).

Una búsqueda a través de las tablas de secuencias de inmunoglobulina (Kabat *et al.*, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5ª ed. del Departamento de los EE.UU de Salud y Servicios Humanos, Publicación NIH N° 91-3242 (1991)), muestra que muchas secuencias de dominio variable humanas son ya bastante similares a los anticuerpos usados para generar las secuencias consenso posicionales. (Véase la Figura 7, en la que se muestra el grado de semejanza de secuencia para un número de anticuerpos probados en paréntesis como “n/m” donde “n” es el número de identidades en posiciones homólogas de “m”).

En el método de humanización preferido de los inventores, ilustrado más abajo, no se usa ningún anticuerpo humano simple como modelo marco. Más bien se usa una secuencia consenso basada en los restos marco más representativos de una subclase de anticuerpos humanos. Es decir, la secuencia consenso tiene un número máximo de aminoácidos en común con todos los marcos humanos de la misma subclase. Esto es importante porque el objetivo de humanización es evitar una respuesta inmunológica contra el péptido recombinante modificado. En la práctica, las secuencias de las cadenas variables xenogénicas son alineadas con las secuencias consenso a partir de todas las subclases de la región variable de la especie objetivo y luego es anotado el número de diferencias entre la secuencia consenso y los restos importantes correspondiente en la secuencia xenogénica. La(s) secuencia(s) consenso humana(s) que cuenta(s) con el número más bajo de diferencias es(son) entonces escogida(s). En la humanización del anticuerpo Mc3, como se ilustra más abajo, se usan las secuencias consenso representativas de las subclases V_{KIV} humana y V_{HI} para humanizar las regiones variables de cadena ligera y pesada, respectivamente.

Si, en un cierto caso, hay demasiadas diferencias en el marco escogido (por ejemplo, más de aproximadamente 16), entonces el mismo procedimiento de alineación usando todas las secuencias humanas tabuladas puede ser repetido para encontrar un marco humano específico cuya semejanza con la secuencia xenogénica sea maximizada en las posiciones de los aminoácidos importantes. Así, lo más preferiblemente, la FR de la especie objetivo debe ser una secuencia consenso representativa de una subclase humana; pero cercana en preferencia sería un marco que representaría los restos que son comúnmente observados en anticuerpos humanos (por ejemplo, secuencias encontradas en varios anticuerpos incluso si no son un consenso); o, ausentes que, el marco de cualquier anticuerpo humano.

Las Figuras 8 y 9 ilustran además que muchos de los aminoácidos de FR importantes están en posiciones similares en anticuerpos diferentes, y muchos de estos están flanqueando las CDR. Entre estas posiciones flanqueantes están la mayor parte de los restos marco que están implicados en contactos con el dominio opuesto como se muestra en la Figura 4, y muchos de los que están en contacto con las CDR como se muestra en las Figuras 2 y 3 anteriores. Además, casi todos los restos marco que han sido observados que participan en la unión al antígeno (Amit, A. G., *et al.*, *Science* **233**:747-753 (1986); Sheriff, *et al.*, *P.N.A.S. (USA)* **82**:1104-1107 (1987); Padlan, E. A., *et al.*, *P.N.A.S. (USA)* **86**:5938-5942 (1989); Tulip, *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **54**:257-263 (1989); Bentley, *et al.*, *Nature* (Londres) **348**:254-257 (1990)), están en estas regiones flanqueantes.

Así, en estos métodos preferidos para “animalización” o “humanización”, no solamente las CDR son conservadas, sino que también algunos restos inmediatamente adyacentes a las CDR. Estos métodos proporcionan una posibilidad mucho mejor de conservar más de las propiedades de unión del ligando del anticuerpo original y, al mismo tiempo, producir un anticuerpo que con mucha menor probabilidad produce una respuesta inmunogénica en una especie heteróloga (tal como una respuesta HAMA en seres humanos). La probabilidad de conservar las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo original es aún mayor si los pocos primeros aminoácidos en los extremos NH_2 -terminal de ambas cadenas también son conservados, ya que algunos de ellos son encontrados que están en contacto con las CDR como se muestra en las Figuras 2 y 3.

Protocolo de humanización

El diseño de un protocolo de humanización implica la aplicación de los principios precedentes en una base de resto-por-resto en un anticuerpo que se humaniza (es decir, el anticuerpo “xenogeneico” o “heterólogo”, con frecuencia un anticuerpo murino). La primera etapa es simplemente alinear la secuencia xenogeneica con la secuencia consenso de FR humana e identificar todas las diferencias de los restos marco. Obviamente, si el resto humano en una posición dada en el consenso es idéntico a la pareja xenogeneica, entonces no se requiere ninguna “humanización” en tal posición.

La siguiente etapa es identificar los restos xenogeneicos que se diferencian del consenso humano, pero que probablemente son restos “importantes”. La utilización de la técnica “retención del resto oculto” (BR-R), los restos “importantes” (es decir, aquellos que deben ser conservados) incluyen: (i) los restos dentro de una CDR; (ii) los restos que probablemente están en contacto con una CDR; (iii) los restos que probablemente están en contacto con la cadena de anticuerpo opuesta; y (iv) los restos ocultos. Usando las secuencias consenso posicionales como plantillas para predecir la posición de restos marco importantes, se puede identificar fácilmente un grupo de restos para mantener.

En la técnica de “modificación del resto oculto” (o BR-M), la secuencia consenso posicional es ajustada para reflejar la eliminación de restos ocultos a partir de la clase de restos marco “importantes”. Las secuencias consenso posicionales de BR-M adecuadas son las descritas anteriormente.

Satisfactoriamente se han aplicado por parte de los inventores estos métodos a la humanización de un anticuerpo monoclonal murino, Mc3, que se espera que sean particularmente útiles en la detección y el tratamiento del cáncer de mama.

Una vez que son seleccionados restos particulares para la retención o la modificación, la construcción real de las regiones variables modificadas puede ser lograda convenientemente usando la amplificación por PCR con cebadores que son adaptados especialmente para producir las mutaciones deseadas, o por síntesis génica. En las realizaciones preferidas, los ADN que codifican las regiones variables humanizadas (que conservaban ciertos restos murinos “importantes”) entonces fueron unidos a los ADN que codificaban las partes de las regiones constantes humanas en un vector híbrido. Después de la transfección del vector en células de mieloma, fueron expresados los polipéptidos de fusión, proporcionando las versiones humanizadas de los anticuerpos Mc3.

Los procedimientos de humanización descritos en este documento son diseñados para reducir al mínimo las potenciales pérdidas en la afinidad de unión al antígeno que podría ser el resultado del cambio del marco de anticuerpo. Para reducir al mínimo además la probabilidad de una respuesta inmunológica frente al anticuerpo humanizado, fueron usadas secuencias de aminoácidos humanas objeto lo que comprende las secuencias consenso de todas las regiones variables humanas apropiadas. Sin embargo, ni los cambios de aminoácidos ejemplificados ni las secuencias ejemplificadas humanas objetivo son las únicas opciones abarcadas por esta invención. Así, muchos otros cambios de aminoácidos individuales y sus permutaciones pueden ser hechos sin afectar sustancialmente a la avidez del anticuerpo resultante. Estos pueden ser particularmente útiles en proporcionar un repertorio dilatado de derivados de Mc3, que probablemente son bastante provechosos en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama. Ahora que satisfactoriamente los inventores han secuenciado las regiones variables del anticuerpo Mc3, puede prepararse una variedad de péptidos de Mc3 recombinantes en los que pueden ser hechas mutaciones conservadoras (incluyendo sustituciones, deleciones y adiciones) que se calcula que son improbables que afecten a la avidez, dirigida por la información proporcionada en este documento así como por el conocimiento en la técnica. Preferiblemente, las variantes conservan un nivel de avidez que es de al menos aproximadamente el 20% de él del Mc3 murino, más preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%.

Un método conveniente para predecir la conveniencia de sustituciones potenciales se realiza comprobando para ver si algún aminoácido particular ha sido incorporado en tal posición en anticuerpos naturales conocidos. La aparición del aminoácido en tal posición en anticuerpos humanos y/o murinos conocidos, especialmente anticuerpos que tienen marcos similares, sugiere que no es incompatible con la arquitectura de la región variable. Así, aunque el resto consenso humano sea el más preferido, pueden ser seleccionadas otras sustituciones preferidas a partir de los restos que han sido observados en las posiciones correspondientes en otros anticuerpos, especialmente aquellas que han sido observadas en varios anticuerpos estrechamente relacionados. Una ilustración de tales comparaciones está descrita, por ejemplo, en la publicación internacional WO94/11509, publicada el 26 de mayo de 1994, de Couto *et al.* (véase, por ejemplo, Tablas 10 y 11).

Los péptidos recombinantes de la presente invención pueden ser proporcionados como péptidos no glicosilados, pero preferiblemente son usados en la forma glicosilada. Cuando se proporcionan en la forma glicosilada, el péptido recombinante puede ser unido operativamente a un(varios) resto(s) glicosilo proporcionados por la célula eucariota en la que se expresa, o puede ser clonado y expresado en una célula procariota como el polipéptido desnudo y el(los) resto(s) glicosilo(s) añadido(s) a partir de éste, por ejemplo, mediante transferasas de glicosilo como se conoce en la técnica. Los ejemplos de resto(s) glicosilo(s) que puede(n) ser añadido(s) al péptido recombinante de la invención son restos N-glicosilados y O-glicosilados, entre otros. Los restos glicosilo añadidos al péptido recombinante desnudo pueden tener un peso molecular de aproximadamente 20 a 50.000 daltons, y más preferiblemente de aproximadamente 100 a 20.000 daltons o mayor, dependiendo del tamaño y del peso molecular del péptido al que están unidos. Sin embargo, otros tipos de polisacáridos y pesos moleculares también pueden estar presentes. Los restos glicosilo y otros grupos

modificante también pueden ser unidos al péptido recombinante desnudo de la invención por medios químicos tal como se conoce en la técnica.

Una simple CDR es la parte más pequeña de un anticuerpo conocido que es capaz de unirse a un antígeno. Se muestran las secuencias de las CDR de V_L y V_H del Mc3 ejemplar recombinante más abajo. Así, pequeños péptidos que tienen la secuencia de CDR simple pueden unirse al antígeno y son, por lo tanto, adecuados para la inmunización de tumores *in vivo*. Una CDR unida a un agente efector puede ser sintetizada químicamente o puede ser codificada recombinantemente en un segmento de ADN. Tales pequeñas moléculas tienen una gran penetración en el tumor y propiedades aclarantes extremadamente rápidas cuando se comparan con fragmentos de anticuerpo más grandes. En algunos casos, es más conveniente producir estas pequeñas moléculas por síntesis química, como se conoce en la técnica, que mediante fermentación. En muchos casos, estos pequeños péptidos son completamente no-inmunogénicos y una respuesta inmune, tal como la respuesta HAMA, es totalmente evitada. También son preferidas 2 y 3 unidades de CDR por cadena operativamente unida a otra por 1 a 10 o más aminoácidos y hasta la longitud del segmento inter-CDR entera como se coloca en las regiones variables.

Las regiones variables recombinantes de cadena pesada y ligera pueden ser obtenidas individualmente o en pares V_H/V_L , o pueden unirse a un agente efector tal como una(varias) región(ones) constante(s) o sus partes, un fármaco, una enzima, una citoquina, una toxina, un anticuerpo entero, o cualquier otra molécula o radioisótopo. Los fragmentos de las regiones variables recombinantes pueden ser sintetizados químicamente como se conoce en la técnica o a partir de los segmentos de ADN que codifican las regiones variables no humanas. Esto puede ser logrado por la amplificación por PCR del ADN con cebadores sintetizados que contienen la(s) mutación(ones) deseada(s) como se conoce en la técnica. Asimismo, los fragmentos que codifican regiones variables recombinantes pueden ser sintetizados químicamente o ser obtenidos por métodos de clonación establecidos de digestión por restricción, ligadura, mutagénesis, y similares, como se conoce en la técnica.

Es posible combinar, por ejemplo, una cadena ligera quimérica con una cadena pesada humanizada y viceversa. Preferiblemente, sin embargo, tanto las cadenas ligeras como las pesadas son humanizadas.

Hay ventajas en la utilización de diferentes variantes moleculares del péptido recombinante dependiendo de las aplicaciones específicas para las cuales son requeridos, algunas de las cuales se enumeran más abajo.

a) Las moléculas más pequeñas penetran en los tejidos objetivos de una manera más eficiente y son limpiadas del cuerpo mucho más rápidamente que las moléculas más grandes.

b) Las moléculas de cadena simple pueden ser manipuladas y sintetizadas de una manera más eficiente que las moléculas de múltiples cadenas.

c) Muchas de estas variantes pueden ser sintetizadas de manera eficiente y económicamente en bacterias, incluyendo los recombinantes no glicosilados.

d) Las moléculas bifuncionales o multifuncionales pueden portar a agentes efectores, tales como enzimas, citoquinas, toxinas, radioisótopos, fármacos y otras moléculas, a un tejido objetivo.

e) Poseer un repertorio de variantes puede ser especialmente útil en procedimientos diagnósticos/terapéuticos en los cuales las particulares versiones derivadas de una estructura de anticuerpo básica pueden ser más o menos útiles en un individuo dado o una clase dada de individuos, o con el tiempo de administración.

Los péptidos recombinantes y los péptidos híbridos de esta invención abarcan las CDR y/o las regiones variables recombinantes, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$ y similares, véase, por ejemplo, O'Kennedy, R., y Roben, P. (O'Kennedy, R., y Roben, P., "Antibody Engineering: an Overview", *Essays Biochem.* (Inglaterra) **26**:59-75 (1991)). Las regiones variables también pueden ser combinadas con regiones constantes, fragmentos catalíticos, enzimas, hormonas, y otras moléculas tales como fármacos y enlazadores, transmisores y toxinas, entre otros. Ya que la especificidad y la afinidad del anticuerpo puede reconocerlo eficazmente frente a un sitio específico que contiene su antígeno cognado, tales combinaciones pueden ser herramientas especialmente eficaces para la inmunización, en terapia y diagnóstico.

Polipéptidos de unión de antígeno de cadena simple

Un método para construir polipéptidos de unión de antígeno de cadena simple ha sido descrito por Bird *et al.* (Bird, R. E., *et al.*, *Science* **242**:243-246 (1988); Bird, R. E., *et al.*, *Science* **244**:409 (1989)). Los F_v de cadena simple (scF_v o sF_v) son péptidos recombinantes de cadena simple que contienen tanto V_L como V_H con un enlazador tal como un péptido que conecta las dos cadenas (V_L -enlazador- V_H). Puede hacerse manipulación genética a nivel del ADN, en cuyo caso se requiere el conocimiento de la secuencia. Estos péptidos recombinantes tienen estabilidad conformacional, plegamiento y afinidad de unión del ligando de fragmentos de inmunoglobulina de región variable de cadena simple y pueden ser expresados en *E. coli*. (Pantoliano, M. V., *et al.*, *Biochem. (EE.UU)* **30**:10117-25 (1991)). El péptido enlazador que une las dos cadenas puede ser de longitud variable, por ejemplo, de aproximadamente 2 a 50 restos de aminoácidos, y más preferiblemente de aproximadamente 12 a 25 restos, y puede ser expresado en *E. coli*. (Pantoliano, M. V., *et al.* (1991), *supra*). Un péptido recombinante tal como un scF_v puede ser expresado y

preparado con *E. coli* y ser usado para el reconocimiento del tumor. Los perfiles de aclaración para scF_v en algunos fragmentos de situaciones son ventajosos en relación con aquellos de anticuerpos normales, fragmentos Fab, Fab' o F(ab')₂. (Colcher, D., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* **82**:1191-7 (1990)). Otro tipo de péptido recombinante comprende un V_H-enlazador-V_L y puede tener de aproximadamente 230 a 260 aminoácidos. Un gen sintético que usa codones de *E. coli* puede ser usado para la expresión en *E. coli*. Un péptido líder de aproximadamente 20 aminoácidos, tal como el Trp LE, puede ser usado para dirigir la secreción de proteínas en el espacio o medio periplásmico. Si este péptido líder no se divide naturalmente, el péptido recombinante de sF_v puede ser obtenido por división ácida del único enlace peptídico asp-pro colocado entre el péptido líder y la región de codificación de sF_v (Houston, J. S., *et al.*, "Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Recombinant Produced in *E. coli*.", *PNAS (USA)* **85** (16):5879-83 (1988)). La construcción, propiedades de unión, metabolismo y el reconocimiento tumoral de los péptidos recombinantes de F_v de la cadena simple derivados de anticuerpos monoclonales puede ser llevada a cabo como se ha descrito previamente (Milenic, D. E., *et al.*, *Cancer Res. (US)* **51** (23 pt1): 6363-71 (1991); Yokota, *et al.*, "Rapid Tumor Penetration of a single-chain Fv and Comparison with Other Immunoglobulin Forms", *Cancer Res. (US)* **52** (12):3402-8 (1992)). Este tipo de péptido recombinante proporciona una penetración en el tumor extremadamente rápida y hasta una distribución global de la masa del tumor comparado con IgG o fragmentos de Fab y F(ab')₂ de Ig.

ScF_v -Fxn bifuncional o Fxn-scF_v

Un ejemplo de este tipo de péptido recombinante es un V_L-enlazador-V_H con un agente efector tal como una hormona, enzima, citoquina, toxina, transmisor, y otros similares. Estos péptidos recombinantes híbridos pueden prepararse como se describe en McCarney *et al.* (McCarney, J. E. *et al.*, "Biosynthetic Antibody Binding Sites: Development of a Single-Chain Fv Model Based on Antidinitrophenol IgA Myeloma MOPC 315", *J. Protein Chem.* **10** (6):669-83 (1991)). Un péptido recombinante híbrido bifuncional que contiene un fragmento B de unión a F_c del extremo amino-terminal de la proteína A de estafilococo a una región de F_v recombinante de cadena simple de la especificidad presente también se incluye y puede prepararse como se ha descrito previamente. (Tai, M. S., *et al.*, *Biochem.* **29** (35):8024-30 (1990)). En este ejemplo de un péptido recombinante híbrido de esta invención es un polipéptido de fragmento B (anti F_c)-scF_v de estafilococo. El orden es inverso a casos normales. Este FB-sF_v puede ser codificado en un solo gen sintético y expresado como péptido en *E. coli*. Este péptido recombinante es un buen ejemplo de un polipéptido útil de cadena simple reconocible multifuncional. Un péptido recombinante híbrido que comprende también anticuerpos frente a un receptor de carcinoma humano y angiogenina es también parte de esta invención. La angiogenina es un homólogo humano de la ARNs pancreática. Es un efector peptídico de anticuerpo-enzima del tipo F(ab')₂. Otro péptido recombinante híbrido que comprende una ARNs de cadena pesada V_H-CH1 puede ser expresado en una célula que secreta una cadena ligera química del mismo anticuerpo. Se mostró que un anticuerpo secretado de estructura similar causaba la inhibición del crecimiento y de la síntesis de proteínas de células K562 que expresan el receptor de transferrina humano (Rybak, S. M., *et al.*, "Humanization of Immunotoxins", *PNAS* **89**:3165-3169 (1992)).

Anticuerpos bi-específicos

Un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo puede ser incorporado en un péptido recombinante bi-específico como se describe, por ejemplo, en Greenman *et al.* (Greenman, J., *et al.*, *Mol. Immunol.* (Inglaterra) **28** (11):1243-54 (1991)). En este ejemplo, fue construido un F(ab')₂ bi-específico, que comprendía dos F(ab') unidos por un enlace tioéter. Los anticuerpos bi-específicos también pueden ser obtenidos cuando dos anticuerpos enteros son unidos. Otro modo de obtener anticuerpos bi-específicos es mezclando cadenas a partir de anticuerpos diferentes o sus fragmentos. De esta manera, la rama "izquierda" del anticuerpo bi-específico tiene una función mientras que la rama "derecha" tiene otra.

Genotecas de expresión en fago

Los péptidos recombinantes conforme a esta invención pueden ser seleccionados con un sistema fago filamentoso. Este sistema también puede ser usado para expresar cualquier gen de anticuerpos o sus fragmentos así como para seleccionar variantes de anticuerpo mutadas como se describe en Marks *et al.* (Marks, J. D., *et al.*, "Molecular Evolution of Proteins on Filamentous Phage. Mimicking the Strategy of the Immune System", *J. Mol. Biol.* (Inglaterra) **267** (23):1607-10 (1992)). Una genoteca de genes de V_H y V_L o sus recombinantes puede ser clonada y expresada en la superficie de un bacteriófago. Los fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a varios antígenos pueden ser aislados como se ha publicado en Marks (Marks, J. D., "By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage", *J. Mol. Biol.* (Inglaterra) **222** (3):581-97 (1991)).

Modificaciones de oligosacáridos covalentes

Los presentes péptidos recombinantes solos o como péptidos híbridos que comprenden anticuerpos y sus fragmentos, por ejemplo, pueden ser modificados covalentemente utilizando restos de oligosacáridos oxidados. Los péptidos recombinantes híbridos pueden ser modificados en el resto oligosacárido con un péptido marcado con un radioisótopo tal como ¹²⁵I o con un quelato tal como un quelato del ácido dietilentriaminopentaacético con ¹¹¹In. El uso de oligosacáridos proporciona una localización más eficiente que un reconocimiento que se obtiene con anticuerpos radiomarcados en las lisinas o tirosinas de la cadena de aminoácidos (Rodwell, J. D. *et al.*, "Site-Specific Covalent Modification of Monoclonal Antibodies: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluations", *PNAS (USA)* **83**:2632-6 (1986)).

Los fragmentos derivados de las regiones variables pueden ser unidos mediante un péptido o un enlazador no peptídico tal como se conoce en la técnica. Los ejemplos de enlazadores peptídicos son polilisinas, cremalleras de leucina, EGKSSGSGSEJKVD (SEQ ID NO:66) y (GGGS)x3 (SEQ ID NO:67), y polímeros no peptídicos, entre otros.

Los agentes efectores tales como péptidos y no péptidos también pueden ser unidos a los péptidos recombinantes de la invención. Estos incluyen polímeros no peptídicos, monómeros, átomos, etc., que se discuten más abajo.

En otro aspecto, esta invención proporciona un polipéptido que comprende al menos el péptido recombinante de la invención y al menos un agente efector operativamente unido al péptido, sus combinaciones y sus mezclas. Los agentes efectores que pueden ser utilizados en esta invención comprenden péptidos tales como las regiones constantes de un anticuerpo, citoquinas, enzimas, toxinas, polímeros no peptídicos, monómeros, y átomos tales como metales. Los polipéptidos de la invención abarcan péptidos unidos por puentes disulfuro, incluyendo polímeros peptídicos producidos y secretados por una célula que exprese un péptido de la invención.

En una realización particularmente preferida, el agente efector puede comprender un átomo tal como un radioisótopo, una enzima o un marcador fluorescente. Estos agentes efectores son adecuados para análisis *in vivo* e *in vitro* porque permiten la identificación de complejos formados por el péptido de la invención. Los radioisótopos particularmente son preferidos para imagimática *in vivo*. El marcaje del polipéptido se conoce en la técnica (Greenwood, F. C., *et al.*, *Biochem. J.* **89**: 114-123 (1963)). Cuando un polipéptido glicosilado es utilizado, el radiomarcador puede ser unido al resto glicosilo como se conoce en la técnica (Hay, G. W. *et al.*, en "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol **5**:357, Whistler, R. L. Ed., Academic Press, Nueva York y Londres (1965)). Los agentes efectores que comprenden un monómero pueden ser agentes terapéuticos, inmunogénicos o diagnósticos, radioisótopos, ADN, o monómeros de ARN, enlazadores químicos, quelantes química, moléculas transmisoras, sus combinaciones, o sus combinaciones con polímeros peptídicos y no peptídicos o copolímeros y átomos. Los ejemplos de agentes terapéuticos son fármacos antineoplásicos tales como vincristina, fármacos intercalantes, adriamicina, enzimas, toxinas y hormonas, entre otros. Los ejemplos de agentes inmunogénicos son otras vacunas contra tumores como carcinomas r o para otros objetivos. Los ejemplos de agentes diagnósticos son radioisótopos y enzimas, entre otros. Los ejemplos de agentes terapéuticos, inmunogénicos y diagnósticos son toxinas, vacunas, y radioisótopos, entre otros. Los ejemplos de radioisótopos son ¹¹¹In, ³⁵S, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ²²⁵Ac, ¹²⁵I y ^{99m}Tc, entre otros. Los ejemplos de monómeros de ADN y ARN son A, T, U, G, C, entre otros. Los ejemplos de enlazadores químicos son ditiobis(succinimidil)propionato y bis-(sulfosuccinimidil) suberato, entre otros. Los ejemplos de moléculas transmisoras son el cAMP y cGMP, entre otros. Los ejemplos de toxinas son la cadena A de ricina y la cadena A de abrina, entre otros.

Cuando el agente efector es un polímero no peptídico unido al polipéptido recombinante de la invención, éste puede comprender polímeros de éster, éter, vinilo, amido, imido, alquileo, arilalquileo, cianato, uretano, o isopreno, polímeros de ADN, polímeros de ARN, sus copolímeros y sus copolímeros con polímeros peptídicos o monómeros, o tiene átomos marcados unidos a éste. Los ejemplos de éstos son poliésteres, poliéteres, polietilenglicoles, polivinilos, resinas de poliamido y poliimido, polietilenos, politetrafluoroetileno, poli(etileno)terefatalato, polipropileno, caucho de silicona, isoprenos y sus copolímeros, copolímeros de silicona y ácido poliláctico carbonado o poliglicólico o colágeno, y otros similares. Particularmente preferidos son los materiales biodegradables y bio-reabsorbibles o bioabsorbibles, que de ser separados del polipéptido e incluidos en la circulación general no dañarán los tejidos endógenos. El agente efector que es un péptido puede comprender anticuerpos tales como IgA, IgG, IgM, IgE o IgD, la región constante de los anticuerpos de una especie diferente de la región variable o sus fragmentos, y las CDR, regiones variables, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ de los anticuerpos de las clases descritas anteriormente, hormonas, enzimas, péptidos transmisores y anticuerpos enteros, sus combinaciones, y sus combinaciones con polímeros no peptídicos, copolímeros, monómeros y átomos tales como radioisótopos. Los ejemplos de péptidos transmisores y hormonas adecuadas para uso en este documento son insulina, hormona del crecimiento, FSH, LH, endorfinas y TNF, entre otros. Los ejemplos de enzimas son peroxidasa, LDH, fosfatasa alcalina y galactosidasa, entre otros.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser proporcionados como una composición antitumoral con un vehículo o diluyente, preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable o diluyente. El péptido recombinante antitumoral y el polímero híbrido proporcionado en este documento puede estar presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 99,99% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 20% en peso, y todavía más preferiblemente de aproximadamente 1 a 5% en peso. Sin embargo, otras cantidades son también adecuadas. Se conocen vehículos de forma general, y vehículos farmacéuticamente aceptables en la técnica en particular y por eso no se describen en este documento. El vehículo puede ser proporcionado en un recipiente estéril separado o en mezcla con el polipéptido. Típicamente una solución salina, soluciones alcohólicas acuosas, soluciones salinas de albúmina, y soluciones de propilenglicol son adecuadas. Sin embargo, también pueden ser utilizadas otras. Cuando se utiliza con objetivos terapéuticos, el material proteico debe ser de una pureza adecuada para la administración humana, y la composición puede contener otros ingredientes como se conoce en la técnica. Los ejemplos de estos son otros fármacos antineoplásicos tales como adriamicina y mitomicina, citoxan, PALA y/o metotrexato, entre otros. Sin embargo, pueden ser añadidos también otros fármacos terapéuticos, vehículos o diluyentes, adyuvantes inmunológicos y similares. Cuando la composición descrita anteriormente es utilizada para imagimática *in vivo*, ésta puede comprender de aproximadamente 0,001 a 99,9% en peso del péptido recombinante, y más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 25% en peso del péptido recombinante. Típicamente, cuando la composición es utilizada con objetivos terapéuticos, ésta puede contener de aproximadamente 0,001 a 99,9% en peso del péptido recombinante, y más preferiblemente

de aproximadamente 0,01 a 30% en peso del péptido recombinante. Cuando se utiliza para purgar *ex vivo* células neoplásicas de fluidos corporales tal como el fluido espinal, la composición puede comprender de aproximadamente 0,0001 a 50% en peso, y preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 20% en peso del péptido recombinante. Cuando se aplica al diagnóstico de tumores *in vitro* tales como carcinomas, la composición de la invención puede comprender de aproximadamente 0,001 a 35% en peso del péptido recombinante, y más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 10% en peso del péptido recombinante. Otras cantidades, sin embargo, son también adecuadas.

Para los anticuerpos Mc3, tales productos tienen utilidad especial en el tratamiento de los tumores de la mama. Los péptidos Mc3 recombinantes “humanizados” o “parcialmente humanizados” serán por lo tanto útiles para el diagnóstico y el tratamiento de cánceres de mama en seres humanos. Se espera que los anticuerpos Mc3 humanizados sean particularmente adecuados para la administración repetida a un sujeto y para terapia a largo plazo, como en el caso de la metástasis y/o la recurrencia de tumores. De todos los recombinantes descritos e incluidos en este documento, los más adecuados para las aplicaciones *in vivo* son aquellos que exhiben baja o ninguna unión a antígenos en suero y a células normales, tal como el Mc3. Adecuados para usos *in vitro* o *ex vivo* son aquellos que exhiben una buena unión a antígenos de células tumorales tales como antígenos de células de carcinoma y débil o ninguna unión a células normales, tal como el Mc3. Incluso aunque un paciente pueda tener en la circulación una cantidad interferente de una molécula que pueda unirse al péptido recombinante, el péptido todavía puede ser administrado después de la eliminación de tal molécula en suero según procedimientos *ex-vivo* o según la administración de dosis estándar del péptido recombinante o del polímero peptídico de la invención.

Un kit para el diagnóstico de tumores tales como carcinomas puede comprender, por ejemplo, una composición que comprende los polipéptidos de la variante de Mc3 de la presente invención, un soporte sólido, inmunoglobulinas de una especie diferente que se una selectivamente a las regiones constantes del anticuerpo de la variante de Mc3, proteína G o proteína A, e instrucciones para su uso. Este kit diagnóstico puede ser utilizado uniendo covalentemente el antígeno o el péptido recombinante de la invención o su proteína de fusión a un soporte sólido mediante un enlazador como se conoce en la técnica. En una realización particularmente preferida, el soporte está revestido de un polipéptido tal como albúmina metilada como se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.572.901. Cuando una muestra biológica es añadida a un pocillo, el péptido recombinante o el polímero peptídico de la invención se unirá a cualquier antígeno de BA46, presente en la muestra biológica. Si se utiliza un ensayo competitivo, al antígeno soportado usado o a su péptido híbrido es añadida una cantidad conocida del péptido recombinante y la muestra. A partir de entonces, puede ser añadida γ -globulina, proteína G o proteína A en forma marcada para la detección. Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados como se describe en Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C., “Continuous Culture of Fused Cell Secreting Antibody of Predefined Specificity”, *Nature* **256**:495-497 (1975)). Adecuados para el uso en esta invención son anticuerpos tales como IgG, IgM, IgE, IgA, y IgD. La proteína A, proteína G y γ -globulina pueden ser obtenidas comercialmente.

Un kit diagnóstico para detectar tumores tales como carcinomas, y más particularmente carcinomas humanos es proporcionado en este documento que comprende una composición anti-BA46 que comprende un péptido recombinante o el polímero peptídico y un agente efector que comprende una enzima, un radioisótopo, una marcador fluorescente y/o un péptido que comprende la región constante de un anticuerpo de la especie para la cual el uso es requerido, o sus fragmentos capaces de unirse a inmunoglobulinas de región anticonstante, proteína G o A, anticuerpo antitumoral, inmunoglobulinas de región anticonstante, proteína G o proteína A, un soporte sólido teniendo operativamente unido a ello un antígeno que se une específicamente al péptido recombinante anti-BA46 de la invención y el anticuerpo, e instrucciones para su uso. Cuando el agente efector comprende un péptido, tal como la región constante de un anticuerpo de la especie objetivo, el soporte sólido puede tener operativamente unido a ello un anticuerpo que se una específicamente a una parte de una proteína de fusión distinta a la del antígeno de la invención. Esto permite la unión del péptido recombinante antitumoral a la molécula antigénica ahora unida al soporte sólido. Cualquier complejo formado entre el péptido recombinante de la invención y el antígeno tumoral soportado, por lo tanto, permanecerá unido al sustrato sólido. Un ensayo competitivo puede ser llevado a cabo entonces por la adición al antígeno soportado usado de una cantidad conocida del antígeno BA46 y la muestra. La cantidad de antígeno presente en la muestra puede ser obtenida a partir de una curva de dilución por la adición de inmunoglobulinas de región anticonstante, proteína G, proteína A u otras moléculas de unión del anticuerpo, por ejemplo, marcadas, para unirse al péptido recombinante híbrido que ahora está unido al soporte. Este kit puede ser usado en un ensayo competitivo en el que la molécula antigénica soportada compita con el antígeno en la muestra para una cantidad conocida del péptido recombinante de la invención. El ensayo fue descrito por Ceriani, R. L., *et al.* (Ceriani, R. L., *et al.*, *Anal. Biochem.* **201**:178-184 (1992)), siendo incorporado el texto relevante a esto en este documento como referencia.

Un tumor tal como una carcinoma puede ser visualizado *in vivo* y/o diagnosticado administrando a un sujeto, que se sospeche que padece una carcinoma, el péptido recombinante anti-BA46 o el polímero peptídico de la invención en forma radiomarcada, en una cantidad eficaz para alcanzar las células tumorales y unirse a éstas, y detectar cualquier unión localizada del péptido recombinante marcado o del polímero peptídico al tumor. Típicamente, el péptido recombinante o el polímero peptídico de la invención pueden ser administrados en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 5000 mg/kg en peso por tratamiento, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 5000 μ g/kg en peso por tratamiento, y más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 500 μ g/kg en peso por tratamiento. Sin embargo, también pueden ser utilizadas otras cantidades. Los radiomarcadores que pueden ser utilizados son ^{111}In , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{131}I , entre otros. Estos radioisótopos pueden ser detectados con varios contadores de radiactividad y aparatos de visualización conocidos en la técnica, y en amplio uso por la comunidad médica.

La presencia de un tumor, tal como una carcinoma, también puede ser diagnosticada *in vitro* al poner en contacto una muestra biológica con el péptido recombinante antitumoral o el polímero peptídico de la invención para formar un complejo péptido-antígeno recombinante antitumoral con cualquier antígeno tumoral presente en la muestra, y detectar cualquier complejo formado. La muestra biológica típicamente es obtenida a partir de un sujeto, tal como un ser humano que se sospeche que padece de un tumor. Muestras biológicas adecuadas son suero, sangre, esputo, excremento, fluido linfático, fluido espinal, secreciones pulmonares y orina, entre otros, preferiblemente sangre o suero. Claramente, cualquier fuente de fluido, tejido y similares puede prepararse para uso en este método, como se conoce en la técnica.

En una realización preferida del método diagnóstico *in vitro*, los péptidos recombinantes anticarcinomas o polímeros peptídicos añadidos a la muestra biológica comprenden un polipéptido de la variante Mc3 marcado. Los materiales de marcaje adecuados fueron los descritos anteriormente. Este método puede ser puesto en práctica, con el soporte sólido que contiene el kit descrito anteriormente, como un ensayo competitivo como se describe en Ceriani, R. L., *et al.* (*supra*).

Los presentes péptidos recombinantes son también aplicables para purgar células neoplásicas, tales como células de carcinoma, a partir de muestras biológicas, siendo muestras de tejido o de fluidos. Purgar células neoplásicas a partir de una muestra fluida es parte de la invención y puede ser puesto en práctica poniendo en contacto un fluido biológico, sospechado de comprender células neoplásicas, con el péptido recombinante de la invención, que es capaz de unirse selectivamente a un antígeno de las células neoplásicas y permitir al péptido unirse al antígeno, y separar el complejo péptido-célula recombinante del resto del fluido.

Este método puede ser utilizado para purgar células no deseadas *ex vivo* extrayendo una muestra biológica de un paciente, eliminando las células neoplásicas de ésta por la separación de los complejos péptido-célula recombinantes o por una adición posterior de un efector tal como el complemento o una toxina o un marcador radiactivo que pueda actuar sobre la célula y luego administrar de nuevo la muestra purgada al paciente. Esto es típicamente adecuado para uso en punciones lumbares en las que el fluido espinal está libre de células neoplásicas tales como células de carcinoma antes de la nueva inyección. También pueden ser tratados otros fluidos de esta manera.

Los presentes péptidos recombinantes o polímeros peptídicos también pueden ser aplicados a la evaluación histológica para detectar la presencia de células neoplásicas, tales como células de carcinoma, en un tejido obtenido a partir de un sujeto que se sospecha que padece un carcinoma, por métodos que son estándar en la técnica, tales como la preparación de cortes de tejido y fijación en un sustrato sólido para permitir la aplicación del péptido y luego la evaluación de cualquier unión a células neoplásicas en la muestra, como se indica por la formación de complejos entre el péptido recombinante y los antígenos sobre o en las células.

El crecimiento o el tamaño de un tumor primario o metastasiado o neoplasia, tal como una carcinoma, puede ser inhibido o reducido administrando a un sujeto en necesidad del tratamiento una cantidad eficaz de los péptidos recombinantes antitumorales o los polímeros peptídicos de la invención. Típicamente, los péptidos recombinantes o polímeros peptídicos pueden ser administrados en una cantidad de aproximadamente 0,001 hasta 2000 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal por dosis, y más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 500 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal por dosis. Dosis repetidas pueden ser administradas cuando se prescriba por el médico que trata. Sin embargo, son también adecuadas otras cantidades. Generalmente, la administración del péptido recombinante o del polímero peptídico es llevada a cabo por infusión de modo que la cantidad de radiomacador, toxina u otro agente efector presente que pueda producir un efecto perjudicial pueda ser mantenida bajo control variando la velocidad de administración. Típicamente, la infusión de una dosis puede durar unas horas. Sin embargo, también se contempla en este documento la infusión constante de una dosis con objetivos terapéuticos que permitirán el mantenimiento de un nivel constante del polipéptido híbrido en el suero.

La infusión del péptido recombinante o del polímero peptídico de la invención puede ser llevada a cabo como sigue. La entubación intravenosa (i.v.) puede ser pretratada, por ejemplo, con 0,9% de NaCl y albúmina de suero humana del 5% y ser colocada para la administración intravenosa. La dosis prescrita del péptido recombinante o del polímero peptídico puede ser infundida como sigue. Opcionalmente, el péptido recombinante no marcado o el polímero peptídico pueden ser infundidos al principio. 30 minutos después de la terminación de la infusión no marcada, puede ser infundido el péptido recombinante marcado con ^{111}In y/o marcado con ^{90}Y o el polímero peptídico. La infusión i.v. puede comprender un volumen total de 250 ml de NaCl del 0,9% y albúmina de suero humana del 5% y puede ser infundida durante un período de aproximadamente 2 horas dependiendo de si se observa algún efecto secundario dependiente de la velocidad. Los signos vitales deben ser tomados, por ejemplo, cada 15 minutos durante la infusión y cada hora después de la infusión hasta que permanezcan estables. Un examen físico cardiopulmonar completo puede hacerse antes de, y en la conclusión, de la infusión. Las medicaciones que incluyen acetaminofen, difenhidramina, epinefrina, y corticosteroides pueden ser consideradas para el tratamiento de reacciones alérgicas si éstas aparecieran. La administración del péptido recombinante o del polímero peptídico de la invención puede ser repetida como se ha visto, si fuera deseable, por un médico. Típicamente, una vez que ha sido administrada una primera dosis y que la imagenología indique que podría haber una reducción del tamaño del tumor, tanto primario o como en metástasis, pueden ser administrados tratamientos repetidos cada aproximadamente de 1 a 100 días, y más preferiblemente aproximadamente de 2 a 60 días. Estos tratamientos repetidos pueden ser seguidos durante aproximadamente 2 años, y en algunas circunstancias hasta durante períodos de tiempo más largos o hasta la desaparición completa del tumor o de los tumores. La administración de los péptidos recombinantes o de los polímeros peptídicos de esta invención es típicamente más útil

para objetivos terapéuticos cuando un tumor primario, por ejemplo, ha sido retirado. Así, preferiblemente, para limpiar después de la intervención quirúrgica o en los casos de metástasis cancerosa que el presente método es de mayor uso. También se proporciona en este documento una secuencia de nucleótidos (ADN o ARN) que codifica un polipéptido de la variante Mc3; y los vectores que comprenden el ADN que codifica Mc3, unidos operativamente a un promotor adecuado para la expresión de los polipéptidos. Típicamente, son adecuados los vectores capaces de replicación tanto en células eucariotas como procariotas. Cuando se desea la preparación de un polipéptido recombinante glicosilado el es vector preferiblemente adecuado para la transfección de células huésped eucariotas.

Esta invención también incluye una célula huésped que ha sido transfectada con el vector híbrido descrito anteriormente. Los huéspedes adecuados son huéspedes procariotas y eucariotas tales como bacterias, levaduras y células de mamífero tales como células de insecto y células de hibridoma no productoras, entre otras. Se conocen vectores adecuados y/o plásmidos para la transfección de cada uno de estos tipos de huéspedes en la técnica y por lo tanto no necesitan ser descritos en este documento. También se conocen en la técnica métodos para clonar secuencias de ADN en cada uno de estos tipos de vectores y para transfectar diferentes tipos de células huésped.

El péptido recombinante que se une específicamente a cualquier antígeno, puede ser producido por un método que comprenda clonar el polidesoxirribonucleótido recombinante de la invención en un vector para formar un vector híbrido, transfectar una célula huésped con el vector híbrido y permitir la expresión del péptido recombinante y aislar el polipéptido o sus mezclas. El segmento de ADN que codifica el polipéptido recombinante puede ser obtenido por síntesis química o por modificación específica del sitio de la secuencia que codifica la región variable de la especie xenogeneica por amplificación por PCR con cebadores específicamente diseñados como se conoce en la técnica. Los ADN del fragmento también pueden ser preparados por PCR con cebadores que introduzcan un codon de terminación en una posición deseada como se conoce en la técnica. El método además puede comprender permitir que los péptidos recombinantes expresados interactúen entre sí para formar péptidos recombinantes de doble cadena, comprendiendo una o ambas cadenas del péptido recombinante al menos una CDR xenogeneica o región variable de la cadena ligera o pesada del anticuerpo o su fragmento modificado como se describe anteriormente. Incluso una parte más de esta invención es un método para producir un péptido recombinante híbrido que comprende un péptido efector y una región humanizada que se une específicamente al antígeno, comprendiendo el método transfectar una célula huésped con el vector híbrido de esta invención que lleva una secuencia de ADN que codifica la región humanizada y el péptido efector, permitir la expresión del péptido recombinante, y aislar el péptido recombinante o sus mezclas. Se conocen técnicas para obtener mRNA, llevar a cabo la transcripción inversa y amplificación por PCR del ADN, la síntesis química de cebadores, clonar secuencias de ADN en un vector, transfectar una célula huésped, y purificar polipéptidos a partir de un medio de cultivo en la técnica y por eso no necesitan ser descritos en este documento.

Como una ilustración de los métodos descritos en este documento, los presentes inventores han emprendido la clonación, secuenciación y humanización del anticuerpo monoclonal murino Mc3 que es probablemente particularmente útil en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama humano.

Mc3 es un anticuerpo murino que reacciona con el antígeno de globulina de grasa de leche materna BA46. Primero se construyó una versión quimérica de Mc3 como se describe en los Ejemplos 1-3 más abajo. Después, se humanizaron satisfactoriamente las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de Mc3 usando la técnica BR-M como se describe en este documento.

Los resultados descritos más abajo confirmaron que los inventores podían humanizar Mc3 sin sacrificar la avidéz. En particular, los inventores no detectaron ninguna diferencia significativa entre las formas originales y humanizadas de Mc3, como se mide con sus afinidades (3×10^8 frente a $6,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectivamente) y por su capacidad de competir por la unión del antígeno. En un modelo de ratón para el cáncer de mama humano, dosis únicas de Mc3 radiomarcado humanizado fueron encontradas que se distribuían al sitio del tumor y que prevenían así el crecimiento del tumor.

Los Ejemplos presentados más abajo son proporcionados como una guía más para el médico experto ordinario en la técnica, y no están para que sean interpretados como una limitación de la invención de ningún modo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación de cADN que codifican las cadenas V_L y V_H del anticuerpo monoclonal murino Mc3

Los cADN que codifican las regiones variables de Mc3 fueron clonados, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores utilizados en la PCR eran específicos para los péptidos líder y para las regiones constantes, respectivamente. Así, las regiones variables estaban contenidas en los productos de la PCR, pero no se traslaparon con los cebadores. Los cebadores de la PCR fueron comprados en Novagen (Madison, Wis.). Novagen fabrica colecciones de cebadores para clonar específicamente cADN que codifican las regiones variables de cADN murinos. El sustrato para la PCR era el ARN poliadenilado aislado a partir de hibridomas de Mc3 (Ceriani, R. L., *et al.* (1983) *Somatic Cell Genet* **9** (4): 415-27). Los detalles experimentales para clonar los cADN que codifican las regiones variables de anticuerpos, utilizando la PCR, han sido previamente descritos (Couto, J. R., *et al.* (1993) *Hybridoma* **12** (1): 15-23; y Couto, J. R., *et al.* (1993) *Hybridoma* **12** (4): 485-489).

En breve, los procedimientos utilizados en este documento eran para la transcripción inversa (RT) de ARN que codificaban las regiones variables y la amplificación subsecuente de los cADN por reacción en cadena de la polimerasa. El ARN poliadenilado fue aislado con un kit de aislamiento de mRNA FAST TRACK® (Corporación Invitrogen, San Diego, California).

Un grupo cebador de Ig murino para PCR fue comprado en Novagen (Madison, Wis.), y el ADN complementario (cADN) fue preparado con un kit de PCR de ARN (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, Conn.).

Dos cebadores del “péptido líder” diferentes y degenerados combinados con un cebador de “región constante” simple degenerado fueron utilizados para cada uno de los aislamientos, y en cada caso fueron realizados tres aislamientos independientes. Así, los inventores aislaron a tres clones de cADN independientes que codificaban para la región variable de la cadena pesada (V_H), y otros tres clones independientes que codificaban para la región variable de la cadena ligera (V_L). Estos productos de la PCR fueron insertados directamente en el vector de clonación de TA pCRII (Invitrogen). En cada caso, ambas cadenas de los insertos resultantes fueron secuenciadas. Las secuencias de los tres aislados independientes de V_H eran todas idénticas como eran las secuencias de los tres aislados de V_L independientes. Se muestran las secuencias de ADN de V_H y V_L y sus secuencias proteicas derivadas en las Figuras 10 y 11, respectivamente.

Secuencia de nucleótidos de la región del péptido señal de V_H

La secuencia siguiente codifica un péptido señal funcional. Esta secuencia, sin embargo, puede no ser la natural si se usa el cebador de la PCR que es específico para la primera parte del péptido señal, para clonar el cADN de V_H , porque se perdió la información de la secuencia original para aquella región. Así, los 26 primeros nucleótidos de la secuencia siguiente pueden ser diferentes en el gen natural.

ATG AAA TGC AGC TGG GTC ATT CTC TTC CTC CTG TCA GGA ACT
GCA GGT GTC CAC TCT (SEQ ID NO:68)

Secuencia de proteína derivada del péptido señal de V_H

Los 9 primeros aminoácidos de la secuencia siguiente no pueden ser idénticos a los originales. Véase la nota para el ADN de codificación del péptido señal anterior.

M K C S W V I L F L L S G T A G V H S (SEQ ID NO:69)

Secuencia de nucleótidos del péptido señal de V_L

La secuencia siguiente codifica un péptido señal funcional. Esta secuencia, sin embargo, no puede ser la natural si se usa el cebador de la PCR que es específico para la primera parte del péptido señal, para clonar VL cADN, porque se perdió la información de la secuencia original para aquella región. Así, los 19 primeros nucleótidos de la secuencia siguiente pueden ser diferentes en el gen natural.

ATG GAG TTC CAG ACC CAG GTC TTT GTA TTC GTG TTT CTC TGG
TTG TCT GGT GTT GAC GGA (SEQ ID NO:70)

Secuencia de proteína del péptido señal de V_L

Los 7 primeros aminoácidos de la secuencia siguiente no pueden ser idénticos a los originales. Véase la nota para el ADN de codificación del péptido señal anterior.

M E F Q T Q V F V F V F L W L S G V D G (SEQ ID NO:71)

Secuencia completa de V_H y V_L

Se muestra la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos completa para la región variable de la cadena pesada de Mc3 en la Figura 10. Se muestra la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos completa para la región variable de la cadena ligera (kappa) de Mc3 en la Figura 11. La identificación de las secuencias fue hecha comparándolas con las bases de datos publicadas por Kabat *et al.*, *supra*. Se muestran los aminoácidos en un código de letras. Los aminoácidos en minúscula representan los péptidos líder. Los nucleótidos en minúscula representan los traslapes de la secuencia del cebador y, por lo tanto, no pueden corresponder a las secuencias naturales.

Ejemplo 2

Construcción de genes de ChMc3, versión quimérica de Mc3 con regiones constantes humanas

5 Los fragmentos de ADN que codifican las regiones V_H y V_L así como los péptidos líder apropiados fueron amplificados, por PCR, directamente a partir de los clones de pCRII respectivos descritos anteriormente, usando cebadores que contenían sitios de restricción terminales apropiados para la inserción en vectores de expresión. Los cebadores de la PCR usados para este fin fueron como sigue:

10

Nombre del cebador: JO65

Sitio de restricción terminal: SaII

15

Especificidad del cebador: cadena kappa, región J

Dirección del cebador: antisentido.

Secuencia del cebador:

20

GTCGACTTAC G TTT TAT TTC CAA GTT TGT CCC CGA GCC

25

(SEQ ID NO:72)

30

Nombre del cebador: JO66

Sitio de restricción terminal: NheI

Especificidad del cebador: cadena pesada, región J

35

Dirección del cebador: antisentido.

Secuencia del cebador:

40

GCT AGC TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT TC (SEQ ID NO:73)

45

Nombre del cebador: JO67

Sitio de restricción terminal: EcoRV

50

Especificidad del cebador: Kappa cadena, péptido señal

Dirección del cebador: sentido

Secuencia del cebador:

55

GATATC CACC ATG GAG TTC CAG ACC CAG GTC TTT GTA TT

60

(SEQ ID NO:74)

65

Nombre del cebador: JO68

Sitio de restricción terminal: HpaI

Especificidad del cebador: Péptido señal de la cadena pesada

Dirección del cebador: sentido

Secuencia del cebador:

GTTAAC CACC ATG AAA TGC AGC TGG GTC ATT CTC TT
(SEQ ID NO:75)

La ADN polimerasa de Vent (Biolabs de Nueva Inglaterra) fue usada en estas PCR por su alta fidelidad. Las condiciones de reacción fueron como las descritas en el catálogo de Biolabs de Nueva Inglaterra. Los productos de la PCR que codifican para V_H y V_L resultantes fueron insertados primero en pBLUESCRIPT II[®] (Stratagene) que habían sido digeridos con EcoRV. Los clones intermedios resultantes entonces fueron digeridos con las enzimas de restricción apropiadas, véase más arriba, y los insertos de ADN fueron transferidos en los vectores pAH4604 y pAG4622 respectivamente.

Estos vectores, que codifican tanto la región constante 1 gamma humana o una región constante kappa humana, fueron desarrollados (Coloma, M. J., *et al.* (1992) *J Immunol Methods* **152** (1): 89-104) y fueron amablemente proporcionados por S. L. Morrison (departamento de Microbiología y Genética Molecular, UCLA). Los insertos fueron secuenciados de nuevo en ambas direcciones directamente en los vectores pAH4604 y pAG4622. Ambos vectores fueron derivados de pSV2 (Mulligan, R. C., y Berg, P. (1980) *Science* **209**:1422-1427), y contienen fragmentos genómicos que codifican los dominios constantes de la cadena pesada o ligera. Los vectores aceptan los cADN que codifican las regiones F_V . Para ligar los cADN de F_V a los vectores, fueron añadidos extremos de restricción a los cADN en un grupo de reacciones PCR, usando los cebadores JO65, JO66, JO67 y JO68.

El vector de cadena ligera de pAG4622 contiene el gen para la región constante de la cadena κ humana, incluyendo el intrón J-C. Éste codifica la xantina-guanina fosforibosil-transferasa o gpt (Mulligan, R. C., y Berg, P. (1981) *PNAS (USA)* **78**:2072-2076) como marcador seleccionable dominante. Éste acepta el cADN de V_L murino entre el sitio de unión al ribosoma (Kozak, M. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**:857-872), que es precedido por el promotor de V_H del anticuerpo monoclonal murino anti-dansilo 27.44 (Coloma, M. J., *et al.* (1992) *J Immunol Methods* **152** (1): 89-104), y el intrón J-C. El intrón J-C contiene un potenciador de la cadena κ (Potter, H., *et al.* (1984) *PNAS (USA)* **81**:7161-7165; y Emorine, L., *et al.* (1983) *Nature* **304**: 447-449).

El vector de cadena pesada de pAH4604 contiene el gen para la región constante $\gamma 1$ de la cadena pesada, pero ningún intrón J-C. Éste codifica la histidinol-deshidrogenasa o hisD (Hartman, S. C. y Mulligan, R. C. (1988) *PNAS (USA)* **85**: 8047-8051) como marcador seleccionable dominante. Éste acepta el cADN de V_H murino entre el sitio de unión del promotor de dansilo-ribosoma y el gen $\gamma 1$ constante. El vector también contiene un inserto que codifica el potenciador de cadena pesada (Rabbits, T. H. *et al.* (1983) *Nature* **306**: 806-809).

Ejemplo 3

Preparación y caracterización de anticuerpos $Mc3$ quiméricos ($ChMc3$)

Todos los procedimientos utilizados en este Ejemplo han sido descritos detalladamente en publicaciones anteriores (Couto, J. R., *et al.* (1993) *Hybridoma* **12** (1): 15-23; y Couto, J. R., *et al.* (1993) *Hybridoma* **12** (4): 485-489). Las condiciones de cultivo del tejido fueron generalmente como sigue: células SP2/0-Ag14 (Shulman, M., *et al.* (1978), debajo) fueron cultivadas tanto en medio Eagle modificado de Dulbecco (DME): suero fetal bovino (FBS), 90:10 (v/v) o en una mezcla de DME:RPMI:FBS, 45:45:10 (v/v/v) o RPMI:FBS, 90:10 (v/v). Fueron añadidas penicilina y estreptomycin para prevenir el crecimiento bacteriano. Cuando se utilizaba medio sin suero, éste contenía un suplemento de HL-1 como sugiere el fabricante (Laboratorios Ventrex, Portland, I.). El medio congelante fue 10% de DMSO en suero bovino.

En breve, después de la verificación de la secuencia, ambas contrucciones de plásmido fueron electroporadas en células SP2/0-Ag14 de mieloma. Los sobrenadantes de transfectantes estables fueron analizados para detectar la presencia del anticuerpo quimérico. El anticuerpo quimérico secretado primero fue capturado por el anticuerpo policlonal de cadena κ antihumano de cabra unido a la placa, y posteriormente fue desarrollado con un anticuerpo policlonal de cadena γ antihumano de cabra secundario radiomarcado. El anticuerpo quimérico también fue analizado por unirse a una preparación de globulina de grasa de leche materna unida a la placa (HMFG).

Transfectantes estables que expresan el anticuerpo quimérico que se unió a HMFG fueron clonados primero y luego cultivados en medio sin suero sin proteínas (Sigma N° de cat. S2772). Entonces fue purificado ChMc3 a partir del medio usando una columna de proteína A (BioRad). El anticuerpo purificado corrió como una sola banda ancha en SDS-PAGE no reductora del 7,6%. Su migración en gel coincidió con la de otros anticuerpos purificados cargados en el mismo gel. En condiciones reductoras, esta banda se resolvió en dos bandas de aproximadamente 53 kDa y 29 kDa respectivamente, y su migración coincidió con la de otros anticuerpos reducidos cargados en el mismo gel.

Ejemplo 4

10 *Determinación de la afinidad de ChMc3 para HMFG*

Las constantes de afinidad anticuerpo-antígeno para el anticuerpo quimérico murino-humano (ChMc3) fueron determinadas obteniendo el valor recíproco de la concentración del anticuerpo monoclonal no marcado competitivo dando una unión del 50% como se describe en Sheldon *et al.* (1987) *Biochem. Cell Biol.* **65**: 423-428. El protocolo para el ensayo fue como sigue.

Fueron preparadas placas de microtítulo (Dynatech, Chantilly, Va.) con HMFG de acuerdo con técnicas estándar (como se describe en Ceriani *et al.*, en “Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines” (T. J. McKern *et al.* eds.), págs. 398-402, Nueva York, Plenum Press, 1984). A cada pocillo le fueron añadidos 25 μ l de 125 I-Mc3 en tampón RIA (suero de becerro bovino del 10%, 0,3% de TRITON X-100 (®), azida de sodio del 0,05% pH 7,4, en solución salina de fosfato tamponada), y compitió con 25 μ l de anticuerpo murino no marcado o anticuerpo quimérico murino-humano en tampón RIA a concentraciones finales en el intervalo nanomolar.

Fueron realizadas yodaciones con 125 I (17 Ci/mg, Nordion Internacional Inc., Kanata, Ontario, Canadá). Fueron marcados 50 μ g de anticuerpo monoclonal Mc3 (a una actividad específica de ~ 10 mCi/mg) utilizando el método T de cloramina como se describe en Ceriani, R. L., y Blank, E. W. (1988) *Cancer Res.* **48**: 4664-4672. Cuando se representaba el cpm del anticuerpo Mc3 murino radiomarcado unido (MuMc3) en el eje de ordenadas y el logaritmo de la concentración nanomolar (nM) del anticuerpo MuMc3 no marcado competitivo o del anticuerpo quimérico murino-humano (ChMc3) en el eje de abscisas, los anticuerpos exhibieron perfiles de competición similares (figura no mostrada).

La afinidad del anticuerpo quimérico purificado (ChMc3) para HMFG fue determinada que era $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, lo que coincide estrechamente con la constante de afinidad observada para el anticuerpo Mc3 murino de $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Además, los inventores determinaron en experimentos competitivos que ChMc3 compite también con Mc3 contra la unión de Mc3 radiomarcado a HMFG. Así, tanto la afinidad como la especificidad del anticuerpo murino original fueron conservadas en su pareja quimérica. Estos resultados de afinidad y competición indican además que los anticuerpos son auténticos.

Ejemplo 5

40 *Identificación de un modelo consenso humano para la dirección de la humanización de Mc3*

Los inventores razonaron que la mínima versión humanizada inmunogénica de Mc3 sería una en la que las secuencias de V_L y V_H se aproximarían en las secuencias consenso de las subclases de V_L y V_H humano, respectivamente. Así, en vez de escoger las secuencias de V_L y V_H de un anticuerpo particular como objetivo, se escogieron las secuencias consenso de las subclases V_{KIV} y V_{HI} humanas, para V_L y V_H respectivamente (Kabat, E. A. *et al.* (1991). “Sequences of proteins of immunological interest”. Departamento Estadounidense de Salud y Servicios Humanos, NIH).

Estas regiones variables consenso humanas son las más similares a las regiones variables correspondientes de Mc3. La mayor parte de los restos marco importantes fueron idénticos en los marcos consenso murino y humano, pero algunos no lo fueron. Se muestra el modelo consenso humano para la región variable de la cadena pesada de Mc3 en la Figura 12 y para la región variable de la cadena ligera se muestra en la Figura 13.

Las posiciones en las cuales el resto murino difería del resto consenso humano entonces fueron analizadas de acuerdo con la técnica BR-R o la técnica BR-M, para determinar si el resto era o no modificado para la humanización, como se ilustra más abajo.

Ejemplo 6

60 *Aplicación de la técnica “modificación del resto oculto” (BR-M) a la humanización de Mc3*

Usando la técnica “modificación del resto oculto” (o técnica BR-M), los restos “importantes” que eran conservados incluyen: (i) los restos dentro de una CDR; (ii) los restos que probablemente están en contacto con una CDR; (iii) los restos que probablemente están en contacto con la cadena del anticuerpo opuesta. En contraste con la técnica BR-R, los restos ocultos pueden ser, y preferiblemente son, humanizados.

La posición de la secuencia probable de los restos “importantes” fue determinada aplicando un consenso posicional conservador desarrollado para la aplicación de la técnica BR-M, como se describe anteriormente. El consenso

ES 2 293 642 T3

posicional para V_L fue como sigue: 1-5, 7, 22, 23, 35, 36, 38, 43-46, 48, 49, 58, 60, 62, 66, 67, 69, 70, 71, 85, 87, 88, 98, y 100. Para V_H , fue como sigue: 1, 2, 4, 24, 27-30, 36-40, 43-49, 66-69, 71, 73, 78, 80, 82, 86, 91-94, 103, y 105.

La aplicación del método BR-M a la humanización de las regiones variables de Mc3 es ilustrada en una base de resto-por-resto en la Figura 12 y la Figura 13, para las cadenas pesadas y ligeras de Mc3, respectivamente.

El protocolo de humanización de BR-M puede ser resumido como sigue (usando los términos mostrados en la Figura 12 y la Figura 13):

Bajo el título "murino conservado":

Sí (como humano)

resto murino idéntico a consenso humano, humanización no requerida

Sí (CDR)

resto murino diferente del consenso humano pero el resto parecía estar dentro de CDR, murino conservado

Sí (contacto CDR)

resto murino diferente del consenso humano, pero el resto probablemente en contacto con CDR, murino conservado

Sí (cont. intercadena)

resto murino diferente del consenso humano, pero el resto probablemente en contacto con la cadena opuesta, murino conservado

No

resto no ajustado a ninguna de las categorías precedentes y fue humanizado (substituyendo el resto consenso humano)

Bajo el título "humanizado":

N/A

resto murino idéntico a consenso humano, humanización no requerida

Humanizado

restos humanizados si no eran restos "importantes" murinos (como se describe antes)

Humanizado (BR)

indica que el resto humanizado probablemente era un resto oculto (tal resto habría sido conservado con la técnica BR-R)

No humanizado

conservaba un resto murino que fue considerado
"importante"

5

Como se muestra en la Figura 13, la versión humanizada final de V_K difiere sólo en las tres posiciones de FR de la secuencia consenso humana V_K IV correspondiente (Kabat, E. A. *et al.* (1991). "Sequences of proteins of immunological interest". Departamento Estadounidense de Salud y Servicios Humanos, NIH). Las diferencias entre la cadena pesada humanizada y el consenso humano para V_H I son posiciones de 13 FR más numerosas. Sin embargo, una fracción considerable de anticuerpos humanos que pertenecen a esta subfamilia contienen más diferencias de posiciones de FR de sus propias secuencias consenso que tiene V_H de HuMc3. Así, por ejemplo, los inventores encontraron ciertos marcos de V_H I humanos con no menos de 29 diferencias a partir de sus propias secuencias consenso. El número de restos marco ocultos que fueron cambiados de murino a humano fueron 7 en V_K y 5 en V_H .

15

Ejemplo 7

Aplicación de la técnica "retención del resto oculto" (BR-R) a la humanización de Mc3

20

Usando la técnica "retención del resto oculto", todos los restos murinos que probablemente estaban ocultos fueron conservados.

Para aplicar la técnica BR-R a la humanización de Mc3, todos los restos "humanizados (BR)" marcados en las Figuras 12 y 13 habrían sido dejados en su forma original murina. Otros aspectos del protocolo de humanización serían idénticos.

Se muestra la secuencia de aminoácidos de una forma humanizada de BR-R de la región variable pesada de Mc3 en la Figura 14 (utilizando el código de aminoácidos estándar de una letra; las letras minúsculas indican el péptido líder). Se muestra la secuencia correspondiente para la cadena ligera de Mc3 en la Figura 15.

30

Ejemplo 8

Construcción de genes de HuMc3. Versiones humanizadas de los genes de Mc3 quiméricos

35

Las regiones enteras que se humanizaron fueron sintetizadas por el método de la PCR por superposición de oligonucleótidos (Ye, Q. Z. *et al.* (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **186** (1): 143-9). Oligonucleótidos que variaban en tamaños de 49 a 101 nucleótidos fueron sintetizados en un sintetizador de ADN EP PCR-Mate modelo 391 (Applied Biosystems, Foster City, California) utilizando columnas de 40 nmoles, ciclo 1:63, Tritil-apagado. Los oligonucleótidos no fueron purificados antes de su uso y sus concentraciones fueron estimadas usando la fórmula $c = [(A_{260})/30] \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

40

Los cebadores usados en la construcción de genes de HuMc3 son mostrados en las Figuras 16 y 17. Las condiciones de la PCR fueron como sigue: 150 nM de cada uno de cuatro oligonucleótidos internos largos (100-101' meros), 2 μM cada uno de dos cebadores terminales cortos (49-66' meros), 200 μM cada dNTP, KCl 10 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, 0,1% de TRITON X-100 ([®]), MgSO_4 6 mM. La ADN polimerasa de Vent (Biolabs de Nueva Inglaterra), 2 unidades por 100 μl de reacción fueron añadidas después del Archivo 2, debajo, (inicio caliente). Un sistema PCR 9600 GENEAMP ([®]) (Perkin Elmer Cetus) fue programado con la serie siguiente de archivos relacionados: Archivo 1 = [(95°, 5 minutos), (rampa de 1 minuto a 70°), (pausa de 5 minutos)]; Archivo 2 = [(96°, 5 s) (55°, 10 s) (72°, 30 s)]x3; Archivo 3 = [(96°, 5 s) (60°, 10 s) (72°, 30 s)]x29; Archivo 4, siempre]. El Archivo 4 fue repetido al final de la PCR, después de la adición extra de dNTPs (hasta 120 μM cada uno) y 1 unidad de ADN polimerasa de Vent (por 100 μl de reacción).

50

Los fragmentos de ADN sintéticos fueron insertados primero en pBLUESCRIPT digerido con EcoRV II ([®]) (Stratagene). Una vez que se confirmaron las secuencias de los casetes de ADN sintéticos en pequeños plásmidos intermedios, fueron transferidos entonces fragmentos de restricción apropiados en plásmidos de expresión. V_H , codificado en un fragmento de EcoRV-NheI fue insertado en pAH4604 y V_K , codificado en un fragmento de EcoRV-SalI fue insertado en pAG4622 (Coloma, M. J. *et al.* (1992) *J Immunol Methods* **152** (1): 89-104; Couto, J. R. *et al.* (1993) *Hybridoma* **12** (1): 15-23; y Couto, J. R. *et al.* (1993). *Hybridoma* **12** (4): 485-489).

60

Se muestran las secuencias de nucleótidos y polipéptidos correspondientes de la región V_H humanizada de HuMc3v2 en la Figura 18. Se muestran las secuencias de nucleótidos y polipéptidos correspondientes a la región V_L humanizada de HuMc3v2 en la Figura 19.

65

Ejemplo 9

Preparación del anticuerpo Mc3 humanizado (HuMc3)

Las regiones variables humanizadas del Ejemplo 5 (HuMc3) fueron clonadas en los vectores de expresión pAG4622 y pAH4604. Como se describe en el Ejemplo 2 anterior, estos vectores fueron usados para expresar el anticuerpo recombinante resultante. La construcción y la expresión de los genes de anticuerpos humanizados fueron realizadas como se describe para el anticuerpo quimérico en el Ejemplo 3 (así como Couto, J. R. *et al.* (1993) *Hybridoma* **12** (1): 15-23; y Couto, J. R. *et al.* (1993). *Hybridoma* **12** (4): 485-489). La línea celular de mieloma SP2/0-Ag14 no productora, ATCC:CRL 1581 fue transfectada, y los clones productores de anticuerpos fueron aislados como se describe en el Ejemplo 3 y en Couto, J. R. *et al.* (1993) *Hybridoma* **12** (1): 15-23; y Couto, J. R. *et al.* (1993) *Hybridoma* **12** (4): 485-489. La producción del anticuerpo fue generada por el método estándar de añadir OPTIMAB[®] (Nº. de catálogo de Gibco 680-191 OSD) al medio de cultivo en una concentración del 1% de cada uno de los componentes A y B.

Las colonias que secretaron los niveles más altos del anticuerpo en los sobrenadantes fueron subclonadas en medio sin suero y sin proteínas. Los niveles de anticuerpo en el medio fueron medidos con técnicas de radioinmunodetección estándar (Couto J. R. *et al.* (1993), *Hybridoma* **12**:15-23). Un anticuerpo de captura anti-humano- κ de cabra unido a placa fue usado con un anticuerpo secundario anti-humano- κ de cabra marcado con ¹²⁵I, y los valores obtenidos fueron comparados con los de una curva de dilución estándar obtenida en paralelo usando una inmunoglobulina IgG₁ κ humana no relacionada (Nº de catálogo de Sigma I-3889).

El anticuerpo fue purificado a partir del sobrenadante del cultivo de transfectantes Sp2/0-Ag14 por un método similar al del Ejemplo 3: Los anticuerpos monoclonales secretados fueron concentrados mediante una membrana de ultrafiltración DIAFF[®] YM30 de Amicon y fueron purificados usando una columna de proteína A (Ceriani *et al.* (1992), *Anal Biochem* **201**:178-184). La pureza fue verificada en SDS-PAGE. El HuMc3 purificado corrió como una amplia banda sola en SDS- PAGE no reductora del 7,6%. En condiciones reductoras, fueron observadas dos bandas con pesos moleculares aparentes de aproximadamente 53 kDa y 29 kDa.

Ejemplo 10

Comparación funcional de HuMc3 y MuMc3

La afinidad de HuMc3 para HMFG fue medida similar al método descrito en el Ejemplo 3, para confirmar que tenía una actividad de unión comparable a los anticuerpos de ratón y quiméricos de los cuales había sido derivado.

MuMc3, HuMc3, y una IgG₁ κ humana de especificidad no relacionada fueron radiomarcados como en el Ejemplo 4. Las actividades específicas obtenidas estaban entre 6 y 20 mCi/mg.

Los estudios de unión fueron llevados a cabo como se describe antes. Brevemente, fueron preparadas placas de microlitro usando capas sucesivas de BSA metilada (albúmina de suero bovino), glutaraldehído, y una preparación de HMFG sin lípidos (Ceriani R. L. *et al.* (1977) *PNAS (USA)* **74**:582-586). Cada pocillo fue revestido de 100 ng de HMFG. Los experimentos competitivos fueron llevados a cabo añadiendo a cada pocillo una cantidad estándar de ¹²⁵I-MuMc3 y una dilución apropiada de MuMc3 no marcado o HuMc3 en tampón RIA (suero de becerro bovino del 10%, TRITON X-100 0,3 M[®]), azida de sodio del 0,05%, pH 7,4, en PBS). Para la determinación de las constantes de afinidad, cada anticuerpo fue analizado en competición contra sí. La constante de afinidad fue calculada como el recíproco de la concentración del anticuerpo monoclonal no marcado competitivo que dio la unión máxima del 50%.

Las afinidades observadas de MuMc3 y HuMc3 para una preparación de globulina de grasa de leche materna fueron respectivamente $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Estos números confirman que los anticuerpos recombinantes conservan la actividad de unión para HMFG, y que el procedimiento de humanización no cambió sustancialmente la afinidad del anticuerpo original.

Las diferencias de los epítomos reconocidos por dos anticuerpos relacionados pueden ser detectadas cuando ambos compiten por unirse a su antígeno común. La Figura 20 muestra los resultados obtenidos cuando MuMc3 radiomarcado fue usado en experimentos competitivos contra MuMc3 no marcado (círculos no rellenos) o HuMc3 no marcado (círculos rellenos). Los valores en el eje de ordenadas representan la cantidad de ¹²⁵I-MuMc3 unida en presencia anticuerpo no marcado competitivo, en relación con la unión en ausencia del anticuerpo competitivo. Los resultados muestran que MuMc3 y HuMc3 compiten igualmente bien contra MuMc3 marcado, indicando que se unen a epítomos idénticos o estrechamente relacionados.

Ejemplo 11

Estudios de biodistribución

El antígeno de HMFG se sabe que está asociado con cánceres de célula mamaria humanos, y se ha usado como molécula objetivo para la detección mediada por el anticuerpo y terapia. Como se describe antes, HuMc3 fue diseñado para ser un agente de reconocimiento útil para llevar efectores farmacológicos, tales como radioisótopos, a los sitios tumorales. En este Ejemplo, el anticuerpo HuMc3 radiado con yodo y MuMc3 control fueron usados en estudios

de biodistribución en un modelo de ratón de carcinoma de mama humano para confirmar que la actividad de unión demostrada en los ensayos de placa de microtítulo eran también observables *in vivo*.

Fueron comprados en Simonsen (Gilroy, California) ratones nu/nu atímicos de 11 a 12 semanas,. Fueron mantenidos en jaulas y lechos esterilizados, y fueron alimentados con comida esterilizada con irradiación para ratón 5058 de Purina y agua del grifo esterilizada acidificada a pH 2,5. Los ratones fueron mantenidos a una temperatura de 25,6°C a 28,9°C en un ciclo de 12 h de luz y 12 h a oscuras.

El tumor mamario MX-1 humano transplantable fue obtenido del instituto de investigación Mason EG&G (Worcester, MA) (Inoue K. *et al.* (1983). *Chemother Pharmacol* **10**:182-186). El tumor fue establecido en ratones nu/nu en las instalaciones de los inventores de acuerdo con los protocolos estándar. Los tumores fueron cultivados durante 22 días, y fue comenzada la radioinmunoterapia experimental en ratones cuyo volumen de tumor promedio era de aproximadamente 100 mm³. Los volúmenes del tumor fueron medidos con un calibrador, y fueron calculados multiplicando longitud x anchura x altura de la masa del tumor y dividiendo por 2. Los tumores fueron clasificados de acuerdo con el volumen del tumor, y los ratones fueron agrupados de modo que cada grupo tuviera aproximadamente el mismo volumen de tumor promedio.

MuMc3, HuMc3, y un anticuerpo de control IgG1κ humano (Sigma 1-3889) fueron marcados con ¹³¹I como se describe en los Ejemplos 4 y 10, excepto que fue usado Na¹³¹I en lugar de Na¹²⁵I. Las actividades específicas fueron 12,15 mCi/mg, 9,0 mCi/mg, y 11,2 mCi/mg, respectivamente. Los ratones fueron inyectados con 10 μCi de anticuerpo marcado como un solo bolo. Los tejidos fueron disecados, pesados, y contados en varias momentos después de la inyección, y el porcentaje de dosis/gramo inyectada del tejido fue calculado, teniendo en cuenta la desintegración radioisotópica.

La Figura 21 muestra los resultados de los estudios de biodistribución. Las cuatro barras para cada sitio de tejido muestran la actividad presente después de 1, 2, 4 y 8 días, respectivamente (promedio ± error estándar para 5 animales sacrificados en cada punto de tiempo). Los anticuerpos MuMc3 marcado con ¹³¹I y HuMc3 persistieron en el tumor aumentado por un período de al menos 4 días (paneles medios e inferiores). En todos los otros tejidos, el anticuerpo unido disminuyó regularmente durante este período. En comparación, la cantidad del anticuerpo marcado con ¹³¹I no específico que localizó al sitio del tumor era mucho más pequeña (panel superior).

Así, HuMc3 mostró la misma especificidad del tumor que MuMc3. A los 4 días después de la inyección, el porcentaje de HuMc3 inyectado en el sitio del tumor era del 21,3%, y a los 8 días era del 11,1%. La actividad específica relativa en los tejidos era 2,5:1 (tumor:pulmón) y 25:1 (tumor:músculo) a los 4 días. La actividad específica relativa era más alta 8 días después de la inyección.

Ejemplo 12

HuMc3 como agente de reconocimiento para radioterapia del cáncer de mama

Ya que el anticuerpo HuMc3 se une y reconoce eficazmente al antígeno BA46, es un vehículo adecuado para transportar una dosis terapéutica de radiactividad a un sitio con tumor. Esto fue demostrado directamente en el modelo de tumor murino MX-1 del Ejemplo 11, usando una dosis de radiactividad más grande.

¹³¹I era un radioisótopo útil para este objetivo por dos motivos obvios: es fácil trabajar con objetivos experimentales y tiene propiedades que se sabe que son adecuadas para radioinmunoterapia. En particular, emite partículas con una energía más alta que ¹²⁵I y ^{99m}Tc y es por lo tanto capaz de proporcionar una mayor dosis de radiación por mCi; además, la radiación está, en parte, en forma de partículas beta, que son fácilmente absorbidas por los tejidos cercanos. Otros radioisótopos usados con frecuencia para la radioinmunoterapia incluyen ¹¹¹In y ⁹⁰Y.

Así, el anticuerpo HuMc3 fue radiomarcado con ¹³¹I como en el Ejemplo 11, a una actividad específica de 9,0 mCi/mg. Fueron preparados como antes ratones nu/nu que portaban MX-1. Les fue administrada a cinco ratones nu/nu atímicos que portaban el tumor de MX-1 una sola inyección i.p. de 500 μCi de ¹³¹I-HuMc3, diluido en PBS (solución salina de fosfato tamponada) que contenía BSA del 0,1%. Los volúmenes de tumor fueron seguidos durante 30 días después de la inyección, usando el método del calibrador perfilado en el Ejemplo anterior. Seis ratones sirvieron como grupo control, y no les fue inyectado el anticuerpo marcado.

Como se muestra en la Figura 22, el tamaño del tumor inicial tanto para los grupos tratados como para los no tratados fue de aproximadamente 100 mm³. En los ratones tratados, el tamaño del tumor promedio disminuyó a 42 mm³ el día 30 (línea inferior). Al contrario, los tumores en el grupo no inyectado crecieron continuamente hasta alcanzar un tamaño final promedio de 2.100 mm³ (línea superior). Ninguna muerte ocurrió en ninguno de los grupos en los primeros 30 días después de la terapia. A los 61 días, todos los cinco animales tratados estaban todavía vivos, y un animal no tenía ningún tumor detectable. Estos resultados sugieren que HuMc3 es más eficaz en radioinmunoterapia experimental que los anticuerpos monoclonales específicos para otros epítomos BA46 (Peterson *et al.* (1994) 353:1-8 en "Antigen and Antibody Molecular Engineering in Breast Cancer Diagnosis and Treatment", Plenum Press NY).

Ejemplo 13

Eficacia de HuMc3 radiomarcado usando un agente quelante

- 5 Fueron llevados a cabo incluso otros experimentos más para demostrar la conveniencia de Mc3 humanizado como agentes de reconocimiento para la radioterapia.

10 Como saben los médicos expertos en la técnica, cuando el anticuerpo se usa en un estudio clínico o con un isótopo que tiene una semivida corta, generalmente es preferible proporcionar el anticuerpo preconjugado a un grupo de unión, que a su vez sea capaz de recibir el radioisótopo al poco antes de su uso. Los ejemplos preferidos de tales grupos de unión son los quelantes. Véase, generalmente, Brechbiel, MW *et al.* (1991), *Bioconjugate Chem* **2**:187-194. Un ejemplo preferido del grupo de unión del quelante es MXDTPA. El quelante puede ser proporcionado en forma purificada y conjugado al anticuerpo usando tampones que estén esencialmente sin iones metálicos. El conjugado generalmente es almacenado en un ambiente sin metal para evitar la ocupación del sitio de unión en el quelante. Justo antes del uso, el conjugado puede ser mezclado con un radioisótopo adecuado, tal como ^{111}In o ^{90}Y , en condiciones y en una relación molar que permita esencialmente a todo el radioisótopo ser capturado y retenido fuertemente por el conjugado.

- 20 Fueron llevados a cabo experimentos para confirmar que se podía marcar HuMc3 con un quelante sin perturbar la actividad de unión para HMFG, como se observa en los Ejemplos anteriores.

25 MXDTPA fue obtenido de O. Gansow en el NIH, Bethesda, MD. Fue conjugado MXDTPA al anticuerpo según los protocolos estándar (Brechbiel MW *et al.* (1986), *Inorg. Chem.* **25**:2272-2281), como sigue: Aproximadamente 3-5 mg de anticuerpo recombinante o anticuerpo control IgG1 κ humano fueron preparados dializando de la noche a la mañana a 4°C contra 1 litro de NaCl 0,15 M y tampón Hepes 0,05 M, pH 8,6. El MXDTPA fue disuelto en agua sin metal en un volumen de 50 μl para cada 5 mg. La conjugación fue llevada a cabo combinando el anticuerpo con la solución de MXDTPA, e incubando durando 19 h a temperatura ambiente. El MXDTPA libre fue eliminado del anticuerpo conjugado por diálisis contra 3 cambios de tampón de acetato de amonio, pH 6,8, durante 24 h cada uno.

- 30 Fue obtenido ^{111}In de calidad farmacéutica de Amersham, Arlington Heights, IL. El marcaje fue realizado añadiendo ^{111}In al anticuerpo conjugado como se ha descrito anteriormente (Blank E W *et al.* (1992) *Cancer J* **5**:38-44). Las actividades específicas fueron 6 mCi/mg y 1,7 mCi/mg para MuMc3 y HuMc3, respectivamente.

35 La integridad del anticuerpo marcado con ^{111}In fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El modelo de bomba de HPLC de Perkin Elmer 250 fue usado con una columna de filtración de gel de 600x7,5 mm TSK 250. Muestras de 0,1 mL que comprendían 1×10^5 cpm fueron corridas en tampón de NaCl 0,15 M y fosfato 30 mM, pH 6,5 a 0,5 ml/min y una presión de 70 bares. Las fracciones de 0,5 mL fueron recogidas y contadas. Esencialmente toda la radiactividad eluía en una posición correspondiente a la de una IgG $_1$ estándar.

- 40 Fueron llevados a cabo estudios de biodistribución usando el anticuerpo marcado con ^{111}In en el modelo de ratón con tumor de mama MX-1 humano, como en el Ejemplo 11. Cada ratón recibió una sola dosis de 10 μCi (diluído en PBS que contenía BSA del 0,1%) por la vena de cola.

45 Los resultados son mostrados en la Figura 23. Ambos anticuerpos MuMc3 (panel superior) y anticuerpo HuMc3 (panel inferior) se concentraron en el sitio del tumor, y persistieron allí a lo largo del período del experimento. Esto confirma que la capacidad de HuMc3 para localizar al sitio del tumor es comparable con la del anticuerpo murino del cual fue derivado, y que la localización es independiente del método de marcaje o del radioisótopo usado.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo Mc3 recombinante modificado que se une específicamente al antígeno BA46 de la globulina de grasa de leche materna (HMFG), comprendiendo dicho anticuerpo:

(i) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de Mc3 murino mostrada en la Figura 12 o su variante en el que al menos uno, pero menos que 30 restos de aminoácidos, han sido humanizados y en el que los restos de aminoácidos dentro de las CDR, los restos de aminoácidos que están en contacto con las CDR y los restos de aminoácidos que están en contacto con una cadena opuesta del anticuerpo son restos de aminoácidos murinos; y

(ii) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de Mc3 murino mostrada en la Figura 13 o su variante en el que al menos uno, pero menos que 30 restos de aminoácidos, han sido humanizados y en el que los restos de aminoácidos dentro de las CDR, los restos de aminoácidos que están en contacto con las CDR y los restos de aminoácidos que están en contacto con una cadena opuesta del anticuerpo son restos de aminoácidos murinos;

y en el que al menos un resto de aminoácido oculto dentro de la región variable de cadena pesada o de la región variable de cadena ligera ha sido humanizado.

2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos aminoácidos humanizados está a partir de la posición correspondiente en la secuencia consenso humana apropiada de la Figura 12 ó 13, para una región variable de cadena pesada o ligera, respectivamente.

3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que tanto la región variable de cadena pesada como la región variable de cadena ligera son variantes de las secuencias de aminoácidos Mc3 murinas como se define en la reivindicación 1.

4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo comprende además una región constante del anticuerpo u otro agente efector.

5. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la región constante es una región constante del anticuerpo humano.

6. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el agente efector es una citoquina, enzima, toxina, radioisótopo o marcador fluorescente.

7. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos cinco de los restos de aminoácidos en la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera han sido sustituidos con aminoácidos correspondientes de la secuencia consenso humana apropiada de la Figura 12 ó 13, para una región variable de cadena pesada o ligera, respectivamente.

8. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la región variable de la cadena pesada al menos la mitad de los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) en la Figura 12 han sido sustituidos con restos correspondientes de la secuencia consenso humana de la Figura 12.

9. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la región variable de la cadena ligera al menos la mitad de los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) en la Figura 13 han sido sustituidos con restos correspondientes de la secuencia consenso humana de la Figura 13.

10. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que:

en la región variable de cadena pesada al menos el 90% de los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) en la Figura 12 han sido sustituidos con restos correspondientes de la secuencia consenso humana de la Figura 12; y

en la región variable de cadena ligera al menos el 90% de los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) en la Figura 13 han sido sustituidos con restos correspondientes de la secuencia consenso humana de la Figura 13.

11. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que todos los restos catalogados como humanizados o humanizados (BR) han sido sustituidos con restos correspondientes de las secuencias consenso humanas de la Figura 12 ó 13, para las cadenas pesada y ligera, respectivamente.

12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

ES 2 293 642 T3

13. Un ácido nucleico que codifica una variante de la región variable de cadena pesada o ligera como se define en la reivindicación 1, en el que ha sido humanizado al menos un resto de aminoácido oculto.

14. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende la región de codificación de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 62 ó 64.

15. Un método *in vitro* para detectar la presencia de un antígeno HMFG o su fragmento de unión en una muestra biológica, que comprende:

proporcionar una muestra biológica que se sospecha que comprende el antígeno o su fragmento,

añadir a la muestra un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en condiciones eficaces para formar un complejo anticuerpo-antígeno; y

detectar la presencia de cualquier complejo anticuerpo-antígeno formado.

16. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un método para diagnosticar la presencia de un antígeno HMFG o su fragmento de unión en un sujeto que comprende:

administrar al sujeto dicho anticuerpo en condiciones eficaces para suministrar éste a una zona del cuerpo del sujeto que se sospecha que contiene un antígeno HMFG o su fragmento de unión para formar un complejo anticuerpo-antígeno; y

detectar la presencia de dicho complejo antígeno-antígeno.

17. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en un método para suministrar un agente a un sitio objetivo que contiene un antígeno HMFG que comprende:

unir dicho agente a dicho anticuerpo en una posición distinta a la del sitio de unión al antígeno para crear un complejo agente-anticuerpo; e

introducir el complejo agente-anticuerpo al ambiente de dicho sitio de reconocimiento en condiciones adecuadas para unir un anticuerpo a su antígeno cognado.

18. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el sitio de reconocimiento está dentro del cuerpo de un sujeto humano y que la introducción de un complejo agente-anticuerpo comprende administrar el complejo a dicho sujeto.

	ANTICUERPO	RESOLUCIÓN (Å)	VALOR R	CÓDIGO PDB
HUMANO:	NEWM	2,0	0,46	3FAB
	KOL	1,9	0,189	2FB4
MURINO:	McPC603	2,7	0,225	IMCP
	J539	1,95	0,194	2FBJ
	HyHEL-5	2,54	0,245	2HFL
	HyHEL-10	3,0	0,24	3HFM
	R19.9	2,8	0,30	1F19
	4-4-20	2,7	0,215	4 FAB
	36-71	1,85	0,248	6FAB
	B13I2	2,8	0,197	IIGF
	D1.3	2,5	0,184	1FDL

FIG. 1

POSICIÓN		ANTICUERPO						
J539		McPC603	HyHEL-10	HyHEL-5	R19.9	4-4-20	36-71	D1312
								DI.3
								NEWM
								KOL
1	GLU(2)	ASP(5)	ASP(10)	ASP(3)		ASP(8)	ASP(4)	ASP(11)
2	ILE(11)	ILE(15)	ILE(17)	ILE(13)	ILE(5)	VAL(9)	ILE(20)	ILE(10)
3		VAL(3)	VAL(2)	VAL(3)	GLN(2)	VAL(2)	GLN(2)	VAL(2)
4	LEU(7)	MET(6)	LEU(6)	LEU(10)	MET(9)	MET(13)	MET(7)	MET(7)
5		THR(1)			THR(1)	THR(2)		LEU(4)
7								THR(1)
22								THR(4)
23	CYS(1)	CYS(1)	CYS(2)	CYS(2)	CYS(1)	CYS(1)	CYS(1)	SER(6)
35	TRP(3)	TRP(2)	TRP(4)		TRP(2)		TRP(6)	TRP(4)
36	TYR(12)	TYR(16)	TYR(8)	TYR(10)	TYR(22)	TYR(13)	TYR(15)	TRP(4)
45					LYS(12)	LYS(5)		TYR(14)
46	PRO(3)	LEU(6)	LEU(4)	ARG(15)	LEU(5)	VAL(14)	LEU(5)	LEU(6)
48	ILE(1)	ILE(1)	ILE(1)				ILE(3)	VAL(1)
49	TYR(28)	TYR(29)	LYS(13)	TYR(12)	TYR(40)	TYR(22)	TYR(22)	TYR(25)
58	VAL(3)	VAL(3)	ILE(1)	VAL(6)	VAL(6)	VAL(5)	VAL(4)	VAL(5)
60		ASP(1)				ASP(2)		ASP(4)
62				PHE(1)		PHE(1)	PHE(1)	
66								
67	SER(3)							LYS(2)
69	THR(3)		THR(3)			THR(5)	THR(1)	SER(1)
70	ASP(2)				ASP(1)		ASP(6)	THR(1)
71	TYR(14)	PHE(23)	PHE(17)	TYR(17)	TYR(24)	PHE(17)	TYR(17)	TYR(16)
88	CYS(1)		CYS(2)		CYS(1)	CYS(1)	CYS(1)	PHE(19)
98	PHE(8)	PHE(8)	PHE(10)	PHE(5)	PHE(8)	PHE(4)	PHE(8)	CYS(2)
								PHE(14)
								ALA(4)
								CYS(1)
								PHE(3)
								LYS(11)

FIG. 2

POSICIÓN		ANTICUERPO									
	J539	McPC603	HyHEL-10	HyHEL-5	R19.9	4-4-20	36-71	B1312	D1.3	NEWM	KOL
1							GLU(3)				
2	VAL(11)	VAL(3)	VAL(8)		VAL(1)		VAL(7)	VAL(3)	VAL(12)		VAL(9)
4	LEU(2)	LEU(5)	LEU(5)		LEU(2)	LEU(1)	LEU(1)	LEU(1)	LEU(1)		LEU(1)
24		THR(2)	VAL(6)			ALA(1)					
27	PHE(3)	PHE(2)		TYR(14)	TYR(11)	PHE(26)	TYR(4)	PHE(4)	PHE(4)	THR(1)	PHE(3)
28	ASP(9)	THR(5)		THR(3)	THR(6)	THR(4)	THR(2)	THR(3)		SER(1)	ILE(2)
29	PHE(4)	PHE(4)		PHE(10)	PHE(7)	PHE(13)	PHE(6)	PHE(3)	LEU(1)		PHE(4)
30		THR(2)			THR(6)	SER(7)				ASP(6)	
36							TRP(2)				
37		VAL (1)			VAL(1)				VAL(1)	VAL(2)	VAL(1)
38	ARG(1)	ARG(2)	ARG(4)	LYS(2)	LYS(1)	ARG(4)	LYS(2)	ARG(1)			ARG(3)
40				ARG(1)							
46	GLU(3)	GLU(4)	GLU(1)	GLU(27)	GLU(3)	GLU(4)	GLU(9)		GLU(1)		GLU(1)
47	TRP(21)	TRP(29)	TYR(20)	TRP(21)	TRP(13)	TRP(18)	TRP(21)	TRP(23)	TRP(19)	TRP(22)	TRP(15)
48	ILE(1)	ILE(1)	MET(6)	ILE(12)	ILE(13)	VAL(1)	ILE(9)	VAL(3)	LEU(1)	ILE(2)	VAL(1)
49		ALA(2)				ALA(2)		ALA(2)			ALA(2)
66			ARG(11)			ARG(3)		ARG(2)		ARG(2)	ARG(1)
67	PHE(4)	PHE(10)	ILE(9)	ALA(1)		PHE(11)	THR(5)	PHE(12)	LEU(6)	VAL(2)	PHE(10)
68		ILE(1)			THR(1)	THR(11)					THR(2)

FIG. 3A

POSICIÓN		ANTICUERPO										
	J539	McPC603	HyHEL-10	HyHEL-5	R19.9	4-4-20	36-71	81312	D1.3	NENM	KOL	
69	ILE(8)	VAL(6)	ILE(8)	PHE(12)	LEU(5)	ILE(20)	LEU(6)	ILE(11)	ILE(8)	MET(4)	ILE(9)	
71	ARG(7)	ARG(16)	ARG(2)	ALA(1)	VAL(4)	ARG(6)	VAL(6)	ARG(3)	LYS(4)		ARG(9)	
73	ASN(1)	THR(3)				ASP(3)						
78	LEU(4)	LEU(7)	TYR(9)	ALA(1)	ALA(1)	VAL(2)	ALA(1)	LEU(6)	VAL(4)	PHE(5)	LEU(5)	
80						LEU(1)						
82			LEU(2)						MET(1)	LEU(1)		
86						ASP(2)						
92				CYS(1)			CYS(1)		CYS(1)			
93	ALA(4)	ALA(5)		LEU(2)		THR(3)	ALA(1)	THR(5)	ALA(4)	ALA(1)	ALA(3)	
94	ARG(38)	ARG(24)	ASN(11)	HIS(2)	ARG(30)		ARG(23)	ARG(14)	ARG(30)	ARG(22)	ARG(27)	
103	TRP(5)	TRP(9)			TRP(2)	TRP(2)	TRP(5)		TRP(2)	TRP(4)	TRP(4)	

FIG. 3B

POSICIÓN		ANTICUERPO									
	J539	McPC603	HyHEL-10	HyHEL-5	R19.9	4-4-20	36-71	B1312	D1.3	NEWM	KOL
36	TYR(3)	TYR(4)	TYR(3)	TYR(5)		TYR(11)	TYR(7)	TYR(1)	TYR(7)		TYR(5)
38	GLN(10)	GLN(4)	GLN(9)	GLN(5)	GLN(5)	GLN(3)	GLN(6)	GLN(12)	GLN(6)	GLN(7)	GLN(8)
43	SER(7)	PRO(1)	SER(8)	SER(5)	THR(3)			SER(3)	SER(2)	ALA(5)	ALA(1)
44	PRO(10)	PRO(14)	PRO(8)	PRO(11)		PRO(7)	ILE(20)	PRO(16)	PRO(16)	PRO(7)	PRO(13)
46	PRO(3)										
85			MET(2)		THR(5)			VAL(1)		ASP(12)	
87	TYR(6)	TYR(4)	PHE(6)	TYR(2)			PHE(5)	TYR(10)	TYR(8)	TYR(6)	TYR(6)
98	PHE(11)	PHE(8)	PHE(7)	PHE(12)	PHE(12)	PHE(12)	PHE(8)	PHE(13)	PHE(12)	PHE(10)	PHE(15)
100		ALA(2)									

FIG. 4A

POSICIÓN		ANTICUERPO								
J539	McPC603	HyHEL-10	HyHEL-5	R19.9	4-4-20	36-71	B1312	D1.3	NEWM	KOL
37	VAL(4)	ILE(2)	VAL(1)	VAL(4)	VAL(2)	VAL(1)	VAL(2)	VAL(4)	VAL(1)	VAL(4)
39	GLN(10)	GLN(4)	LYS(8)	GLN(5)	GLN(3)	GLN(6)	GLN(10)	GLN(6)	GLN(4)	GLN(7)
43		ASN(4)		GLN(7)			LYS(6)		ARG(19)	
44		ARG(2)								
45	LEU(13)	LEU(12)	LEU(8)	LEU(14)	LEU(8)	LEU(11)	LEU(13)	LEU(14)	LEU(11)	LEU(16)
47	TRP(1)		TYR(2)	TRP(2)				TRP(3)	TRP(2)	
91	TYR(6)	TYR(4)	TYR(3)	TYR(8)	PHE(3)	PHE(4)	TYR(3)	TYR(5)	TYR(3)	
103	TRP(11)	TRP(15)	TRP(16)	TRP(11)	TRP(4)	TRP(18)	TRP(22)	TRP(19)	TRP(8)	TRP(19)
105	GLN(5)									

FIG. 4B

POSICIÓN	J539	McPC603	HyHEL-10	HyHEL-5	R19.9	4-4-20	36-71	B1312	D1.3	NEWM	KOL
2	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	VAL	ILE	VAL	ILE		
4	LEU	MET	LEU	LEU	MET	MET	MET	MET	ILE	LEU	LEU
6	GLN	GLN	GLN	GLN	GLN	GLN	GLN	GLN	GLN	GLN	GLN
11	THR	LEU	LEU	MET	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	VAL	ALA
13	ALA	VAL	VAL	ALA	ALA	VAL	ALA	VAL	ALA		
19	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL
21	ILE	MET	LEU	MET	ILE	ILE	ILE	ALA	ILE	ILE	ILE
23	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS
35	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP
37	GLN	GLN	GLN	GLN	GLN	LEU	GLN	LEU	GLN	GLN	GLN
47	TRP	LEU	LEU	TRP	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU
48	ILE	ILE	ILE	ILE	VAL	ILE	ILE	ILE	VAL		ILE
49										PHE	
58	VAL	VAL	ILE	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL		VAL
61	ARG	ARG	ARG	ARG	ARG	ARG	ARG	ARG	ARG	ARG	ARG
62	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE
71	TYR	PHE	PHE	TYR	TYR	TYR	TYR	PHE	TYR	ALA	ALA
73	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU
75	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE
78	MET	VAL	VAL	MET	LEU	VAL	LEU	VAL	LEU	LEU	LEU
82	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP
83									PHE		
84	ALA	ALA		ALA	ALA		ALA			ALA	THR
86	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR
88	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS
102	THR	THR	THR	THR	THR	THR	THR	THR	THR	THR	THR
104	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	VAL
106	LEU	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	ILE	LEU	VAL	VAL

FIG. 5

POSICIÓN		ANTICUERPO									
	J539	McPC603	HyHEL-10	HyHEL-5	R19.9	4-4-20	36-71	B1312	D1.3	NEWM	KOL
2	VAL	VAL	VAL								
4	LEU	LEU	GLU	LEU	LEU	LEU	VAL	VAL	VAL	LEU	VAL
6	GLU	GLU	GLU	GLN	GLU	GLU	GLN	GLU	GLU	GLN	GLN
9			PRO								
12	VAL	VAL	VAL	MET	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL
18	LEU	LEU	LEU	VAL	VAL	MET	VAL	LEU	LEU	LEU	LEU
20	LEU	LEU	LEU	ILE	MET	LEU	MET	LEU	ILE	LEU	LEU
22	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS
24	ALA	THR	VAL	ALA	ALA	ALA	ALA	ALA	VAL	VAL	SER
27	PHE	PHE	ASP	TYR	TYR	PHE	TYR	PHE	PHE	THR	PHE
29	PHE	PHE	ILE	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE	LEU	PHE	PHE
36	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP	TRP
38	ARG	ARG	ARG	LYS	LYS	ARG	LYS	ARG	ARG	ARG	ARG
40						SER					
46		GLU	GLU	GLU							
48	ILE	ILE	MET	ILE	ILE	VAL	ILE	VAL	LEU	ILE	VAL
49		ALA				ALA		ALA			ALA
66	LYS	ARG	ARG	LYS				ARG	ARG	ARG	ARG
67	PHE	PHE	ILE	ALA	THR	PHE	THR	PHE	LEU	VAL	PHE
69	ILE	VAL	ILE	PHE	LEU	ILE	LEU	ILE	ILE	MET	ILE
71	ARG	ARG	ARG	ALA	VAL	ARG	VAL	ARG	LYS	VAL	ARG
76						SER					
78	LEU	LEU	TYR	ALA	ALA	VAL	ALA	LEU	VAL	PHE	LEU

FIG. 6A

POSICIÓN		ANTICUERPO										
		J539	McPC603	HyHEL-10	HyHEL-5	R19.9	4-4-20	36-71	B1312	D1.3	NEWM	KOL
80		LEU	LEU	LEU	MET	MET	LEU	MET	LEU	LEU	LEU	LEU
	82	MET	MET	LEU	LEU	LEU	MET	LEU	MET	MET	LEU	MET
	82C	VAL	LEU	VAL	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	VAL	LEU
86		ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP	ASP
88		ALA	ALA	ALA		ALA		ALA	ALA	ALA	ALA	
90		TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR	
92		CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS	
94		ARG	ARG	ASN	HIS	ARG		ARG	ARG	ARG	ARG	
107		THR	THR		THR	THR	THR	THR	THR	THR	SER	
109		VAL	VAL	VAL	LEU	LEU	VAL	LEU	LEU	LEU	VAL	
111		VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	

FIG. 6B

ANTICUERPO	DOMINIO	SECUENCIA HUMANA MÁS SIMILAR
HyHEL-10	VH	58P2'CL (77/112)
	VH FRAMEWORK	15P1'CL, ML1'CL (62/87)
	VH IMPT	58P2'CL, Ab26'CL, C6B2'CL (28/38)
HyHEL-5	VL	IARC/BL41'CL (73/107)
	VL FRAMEWORK	IARC/BL41'CL (59/80)
	VL IMPT	IARC/BL41'CL (30/37)
R19.9	VH	ND'CL (74/116)
	VH FRAMEWORK	783c'CL, X17115'CL (63/87)
	VH IMPT	21/28'CL, 51P1'CL, 783c'CL, 8E10'CL, AND, KAS, NEI'CL, X17115'CL (25/37)
	VL	HF2-1/17'CL, KAS (65/105)
	VL FRAMEWORK	HF2-1/17'CL (57/80)
	VL IMPT	BI, DEN, HF2-1/17'CL, KUE, REI, WALKER'CL, WIL(=) (27/36)
	VH	21/28'CL (73/119)
	VH FRAMEWORK	21/28'CL, 51P1'CL, AND, LS2'CL, NEI'CL (60/87)
	VH IMPT	21/28'CL, 8E10'CL, LS2'CL (28/38)
	VL	WALKER'CL (78/107)
	VL FRAMEWORK	RZ (62/80)
	VL IMPT	REI, WALKER'CL (33/36)

FIG. 7A

ANTICUERPO	DOMINIO	SECUENCIA HUMANA MÁS SIMILAR
4-4-20	VH MARCO	30P1'CL (77/116)
	VH MARCO	2P1'CL, 3D6'CL (65/87)
	VH IMPT	4B4'CL, M26'CL (36/41)
J539	VL	RPM1-6410'CL (91/112)
	VL MARCO	GM-607 - 'CL (68/80)
	VL IMPT	CUM, FR, NIM (33/36)
	VH MARCO	30P1'CL, Vh38C1.10'CL (81/118)
	VH IMPT	18/2'CL, 30P1'CL, M43 (71/87)
McPC603	VL	38P1'CL, 56P1'CL, M72, M74 (36/40)
	VL MARCO	PA (62/105)
	VL IMPT	LEN, WEA (53/80)
	VH MARCO	BI, DEN, KUE, REI, WALKER'CL, WIL(=) (26/35)
	VH IMPT	M72 (81/120)
	VL MARCO	4G12'CL, Ab18'CL, M72 (70/87)
	VL IMPT	56P1'CL, M72, M74, RF-SJ2'CL (36/42)
	VL	FK-001'CL, LEN (91/113)
	VL MARCO	LEN (70/80)
	VL IMPT	LEN (38/42)

FIG. 7B

ANTICUERPO	DOMINIO	SECUENCIA HUMANA MÁS SIMILAR
36 - 71	VH	21/28'CL (74/119)
	VH MARCO	21/28'CL, 51P1'CL, 783c'CL, AND'CL, NEI'CL, X17115'CL, (61/87)
	VH IMPT	21/28'CL, 8E10'CL (28/38)
B1312	VL	AG (76/105)
	VL MARCO	RZ (63/80)
	VL IMPT	REI, RZ, WALKER'CL (34/37)
	VH	56P1'CL (83/119)
	VH MARCO	4B4'CL, 4G12'CL, M26'CL, M72, RF-SJ2'CL, Vh36Cl.10'CL (68/87)
	VH IMPT	56P1'CL, M72, M74, RF-SJ2'CL(37/39)
	VL	RPMI-6410'CL (86/112)
	VL MARCO	GM-607-'CL (69/80)
	VL IMPT	CUM, NIM (36/39)
	VH	C6B2'CL (72/116)
D1.3	VH MARCO	C6B2'CL (62/87)
	VH IMPT	M60'CL (32/37)
	VL	BR (75/107)
	VL MARCO	HF2-1/17'CL (64/80)
	VL IMPT	3D6'CL, BI, DEN, EU, KUE, PA, REI, WALKER'CL, WIL(=) (32/36)

FIG. 7C

	CDR1			
J539	EL.L.Q....	T.A.....	V.I.C	sass-----svsslh
McPC603	DIVMTQ....	L.V.....	V.M.C	kssqslnsgnqknfla
HyHEL-10	DIVL.Q....	L.V.....	V.L.C	rasq-----signnlh
HyHEL-5	DIVL.Q....	M.A.....	V.M.C	sass-----svnymy
R19.9	.IQMTQ....	L.A.....	V.I.C	rasq-----disnyln
4-4-20	DVVMQTQ....	L.V.....	A.I.C	rssq-slvsqgntylr
36-71	DIQM.Q....	L.A.....	V.I.C	rasq-----dinnfln
B13I2	.VLM.QT...	L.V.....	A.ISC	rsnq-tillsdgdtyle
D1.3	DI.M.Q....	L.A.....	V.I.C	rasg-----nihnyla
				WYQQ.....SP.PWIIY
				WYQQ.....PP.LLIY
				WYQQ.....SP.LLIK
				WYQQ.....SP.RWIIY
				WYQQ.....T.KLLVY
				WYLQ.....PKVLIY
				WYQQ.....I.LLIY
				WYLQ.....SP.LLIY
				WYQQ.....SP.LLVY
	CDR2			
J539	eisklas	.V..RF.....	Y.L.I..M...	D.A.YYC
McPC603	gastres	.V.DRF....	S.TDF.L.I..V...	D.A.YYC
HyHEL-10	yasqsis	.I..RF.....	T.F.L.I..V...D..	MYFC
HyHEL-5	dtskls	.V..RF.....	Y.L.I..M...D.A.	YYC
B19.9	ytsrlhs	.V..RF.....	DY.L.I..L...D.ATY.C	
4-4-20	kvsnrfs	.V.DRF.....	T.F.L.I..V...D...Y.C	
36-71	ftsrqs	.V..RF.....	TDY.L.I..L...D.A.YFC	
B13I2	kvsnrfs	.V.DRF.....	T.F.L.I..V...D...VYYC	
D1.3	ytttlad	.V..RF.....	S.T.Y.L.I..L...DF..YYC	
				qqwtypplit
				qndhsyplt
				qqsnswppt
				qqwgr-npt
				qqgsttppt
				sqsthpvpt
				qqgnalprt
				fqgshvppt
				qhfwstprt
				F...T.L.L.L.
				F.A.T.L.L.I.
				F...T.L.L.I.
				F...T.L.L.I.
				F...T.L.L.I.
				F...T.L.L.I.
				F...T.L.L.I.
				F...T.L.L.I.

FIG. 8

FIG. 9A

J539	.V.L.E.....V.....L.L.C.A..FDF.	CDR1	kyvms	WVRQ.....LEWI.
McPC603	.V.L.E.....V.....L.L.C.T..FTF.		dfyme	WVRQ.....RLEWIA
HyHEL-10	.V.L.E..P..V.....L.L.C.V..D.IT		sdyws	WIRK...N.LEYM.
HyHEL-5	..L.Q.....M.....V.I.C.A..YTF.		dywie	WVKQR.....LEWI.
R19.9	.V.L.E.....V.....V.M.C.A..YTFT		sygvn	WVKQ...Q..EWI.
4-4-20	..L.E.....V.....M.L.C.A..FTFS		dywmn	WVRQS.....LEWVA
36-71	EV.L.Q.....V.....V.M.C.A..YTF.		sngin	WVKQ.....LEWI.
B1312	.V.L.E.....V.....L.L.C.A..FTF.		rcams	WVRQ...K.L.WVA
D1.3	.V.L.E.....V.....L.I.C.V..F.L.		gygvn	WVRQ.....LEWL.

FIG. 9B

J539	eihp--dsgtynytpsIk	CDR2	KF.I.R.N.....L.L.M..V...D.A.YYCAR
McPC603	asrnkgnkyytteysasvkg		RFIV.R.T.....L.L.M..L...D.A.YYCAR
HyHEL-10	yvs--ysgstyynpslks		RI.I.R.....Y.L.L..V...D.A.YYC.N
HyHEL-5	eilp--gsgstnyherfkg		KA.F.A.....A.M.L..L...D...YYCLH
R19.9	ylnp--gkgylsynekfkg		.TTL.V.....A.M.L..L...D.A.YFC.R
4-4-20	qirnkpyetyyysdsvkg		RFTI.R.D...S.V.L.M..L...D...YYCT.
36-71	ynnp--gngyiaynekfkg		.T.L.V.....A.M.L..L...D.A.YFCAR
B1312	glss--ggsytfypdtvkg		RF.I.R.....L.L.M..L...D.A.YYCTR
D1.3	miw---gdgntdynsalks		RL.I.K.....V.L.M..L...D.A.YYCAR

	CDR3	
J539	lhyygyn-----ay	W.Q.T.V.V...
McPC603	nyygstwyf-----dv	W...T.V.V...
HyHEL-10	wdg-----dy	W....V.V...
HyHEL-5	gnydf-----dg	W...T.L.V...
R19.9	sfyggslavyyfds	W...T.L.V...
4-4-20	sygmm-----dy	W...T.V.V...
36-71	seyygggskf-----dy	W...T.L.V...
B13I2	yssdpfyf-----dy	W...T.L.V...
D1.3	erdyrl-----dy	W...T.L.V...

FIG. 9C

atg aaa tgc agc tgg gtc att ctc ttc CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGT GTC CAC
 m k c s w v i l f l s g t a g v h

 TCT GAG GTC CAG CTG CAA CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGA GCT TCA
 s e v q l q q s g p e l v k p g a s

 ATG AAG ATA TCC TGC GAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC ACT GGC TAT ACC ATG CAC
 m k i s c e a s g y s f t g y t m h

 TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA ATG AAC CTT GAG TGG ATT GGA CTT ATT AAT CCT
 w v k q s h g m n l e w i g l i n p

 TAC AAT GGT GGT ACT GTC TAC AAC CAG AAG TTC CAG GAC AAG GCC ACA TTA ACT
 y n g g t v y n q k f q d k a t l t

 GTA GAC AAG TCA TCC GGC ACA GCC TAC ATG GAG CTC CTC AGT CTG ACA TCT GAG
 v d k s s g t a y m e l l s l t s e

 GAC TCT GCA GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGT TGG AGA TAT ACT ATG GAC TAT TGG
 d s a v y f c a r r w r y t m d y w

 GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA G

FIG. 10

atg gag ttc cag acc cag gtc ttt gta ttc gtg ttt ctc tgg ttg tct ggt gtt	m e f q t q q v f v f v f l w l s g v
GAC GGA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAC AAA TTC ATG TCC ACA TCA GAG GGA	d g D I V M T Q S H K F M S T S E G
GAC TGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG AGT ATT GGT GTA GCC	D W V S I T C K A S Q D V S I G V A
TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TCG GCA TCC	W Y Q Q K P G Q Q S P K L L I Y S A S
TCC CGG TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACG GAT	S R Y T G V P D R Q S G S G S G T D
TTC ACT TTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT	F T F T I S S V Q A E D L A V Y Y C
CAG CAA CAT TAT ACT TCT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAC TTG GAA ATA	Q Q H Y T S P F T F G S G T N L E I
AAA C	
K	

FIG. 11

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _H I)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
1	E	Q	SÍ (CDR CONTACTO)	NO HUMANIZADO	E
2	V	V	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	V
3	Q	Q	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Q
4	L	L	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	L
5	Q	V	NO	HUMANIZADO	V
6	Q	Q	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Q
7	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
8	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
9	P	A	NO	HUMANIZADO (BR)	A
10	E	E	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	E
11	L	V	NO	N/A	V
12	V	K	NO	N/A	K
13	K	K	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	K
14	P	P	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	P
15	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
16	A	A	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	A
17	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
18	M	V	NO	N/A	V
19	K	K	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	K
20	I	V	NO	N/A	V
21	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
22	C	C	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	C
23	E	K	NO	N/A	K

FIG. 12A

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _H D)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
24	A	A	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	A
25	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
26	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
27	Y	Y	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Y
28	S	T	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	S
29	F	F	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	F
30	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
31	G	S	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	G
32	Y	Y	SÍ (CDR)	N/A	Y
33	Y	Y	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	T
34	M	I	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	M
35	H	S	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	H
36	W	W	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	W
37	V	V	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	V
38	K	R	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	K
39	Q	Q	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Q
40	S	A	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	S
41	H	P	NO	HUMANIZADO	P
42	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
43	M	Q	SÍ (CONT. INTERCADENA)	NO HUMANIZADO	M
44	N	G	SÍ (CONT. INTERCADENA)	NO HUMANIZADO	N
45	L	L	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	L
46	E	E	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	E

FIG. 12B

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _H I)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
47	W	W	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	W
48	I	M	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	I
49	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
50	L	W	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	L
51	I	I	SÍ (CDR)	N/A	I
52	N	N	SÍ (CDR)	N/A	N
52A	P	P	SÍ (CDR)	N/A	P
52B	Y	Y	SÍ (CDR)	N/A	Y
53	N	G	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	N
54	G	N	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	G
55	G	G	SÍ (CDR)	N/A	G
56	-	D	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
57	T	T	SÍ (CDR)	N/A	T
58	V	N	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	V
59	Y	Y	SÍ (CDR)	N/A	Y
60	N	A	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	N
61	Q	Q	SÍ (CDR)	N/A	Q
62	K	K	SÍ (CDR)	N/A	K
63	F	F	SÍ (CDR)	N/A	F
64	Q	Q	SÍ (CDR)	N/A	Q
65	D	G	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	D
66	K	R	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	K
67	A	V	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	A

FIG. 12C

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _H I)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
68	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
69	L	I	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	L
70	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
71	V	A	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	V
72	D	D	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	D
73	K	T	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	K
74	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
75	S	T	NO	HUMANIZADO	T
76	G	S	NO	HUMANIZADO (BR)	S
77	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
78	A	A	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	A
79	Y	Y	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Y
80	M	M	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	M
81	E	E	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	E
82	L	L	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	L
82A	L	S	NO	HUMANIZADO	S
82B	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
82C	L	L	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	L
83	T	R	NO	HUMANIZADO	R
84	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
85	E	E	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	E
86	D	D	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	D
87	S	T	NO	HUMANIZADO	T

FIG. 12D

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _H I)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
88	A	A	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	A
89	V	V	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	V
90	Y	Y	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Y
91	F	Y	SÍ (CONT. INTERCADENA)	NO HUMANIZADO	F
92	C	C	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	C
93	A	A	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	A
94	R	R	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	R
95	R	A	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	R
96	-	P	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
97	-	G	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
98	-	Y	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
99	-	G	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
100	-	S	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
100A	-	G	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
100B	-	G	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
100C	-	G	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
100D	-	C	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
100E	W	Y	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	W
100F	R	R	SÍ (CDR)	N/A	R
100G	-	G	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
100H	-	D	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
100I	Y	Y	SÍ (CDR)	N/A	Y
100J	T	X	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	T

FIG. 12E

V_H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V_HI)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
100K	M	F	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	M
101	D	D	SÍ (CDR)	N/A	D
102	Y	Y	SÍ (CDR)	N/A	Y
103	W	W	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	W
104	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
105	Q	Q	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Q
106	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
107	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
108	S	L	NO	HUMANIZADO	L
109	V	V	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	V
110	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
111	V	V	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	V
112	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
113	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S

FIG. 12F

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _{RI})	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
1	D	D	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	D
2	I	I	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	I
3	V	V	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	V
4	M	M	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	M
5	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
6	Q	Q	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Q
7	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
8	H	P	NO	HUMANIZADO	P
9	K	D	NO	HUMANIZADO	D
10	F	S	NO	HUMANIZADO	S
11	M	L	NO	HUMANIZADO (BR)	L
12	S	A	NO	HUMANIZADO	A
13	T	V	NO	HUMANIZADO (BR)	V
14	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
15	E	L	NO	HUMANIZADO	L
16	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
17	D	E	NO	HUMANIZADO	E
18	W	R	NO	HUMANIZADO	R
19	V	A	NO	HUMANIZADO (BR)	A
20	S	T	NO	HUMANIZADO	T
21	I	I	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	I
22	T	N	SÍ (CONTACTO CDR)	NO HUMANIZADO	T
23	C	C	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	C

FIG. 13A

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _H I)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
24	K	K	SÍ (CDR)	N/A	K
25	A	S	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	A
26	S	S	SÍ (CDR)	N/A	S
27	Q	Q	SÍ (CDR)	N/A	Q
27A	D	S	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	D
27B	V	V	SÍ (CDR)	N/A	V
27C	S	L	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	S
27D	I	Y	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	I
27E	G	S	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	G
27F	-	S	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
28	-	N	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
29	-	N	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
30	-	K	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
31	-	N	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
32	-	Y	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	-
33	V	L	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	V
34	A	A	SÍ (CDR)	N/A	A
35	W	W	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	W
36	Y	Y	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Y
37	Q	Q	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Q
38	Q	Q	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Q
39	K	K	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	K
40	P	P	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	P

FIG. 13B

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _H I)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
41	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
42	Q	Q	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Q
43	S	P	SÍ (CONT. INTERCADENA)	NO HUMANIZADO	S
44	P	P	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	P
45	K	K	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	K
46	L	L	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	L
47	L	L	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	L
48	I	I	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	I
49	Y	Y	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Y
50	S	W	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	S
51	A	A	SÍ (CDR)	N/A	A
52	S	S	SÍ (CDR)	N/A	S
53	S	T	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	S
54	R	R	SÍ (CDR)	N/A	R
55	Y	E	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	Y
56	T	S	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	T
57	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
58	V	V	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	V
59	P	P	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	P
60	D	D	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	D
61	R	R	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	R
62	F	F	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	F
63	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S

FIG. 13C

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _H I)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
64	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
65	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
66	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
67	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
68	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
69	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
70	D	D	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	D
71	F	F	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	F
72	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
73	F	L	NO	HUMANIZADO (BR)	L
74	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
75	I	I	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	I
76	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
77	S	S	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	S
78	V	L	NO	HUMANIZADO (BR)	L
79	Q	Q	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Q
80	A	A	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	A
81	E	E	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	E
82	D	D	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	D
83	L	V	NO	HUMANIZADO (BR)	V
84	A	A	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	A
85	V	V	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	V
86	Y	Y	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Y

FIG. 13D

V _H	MC3 MURINO	HUMANO CONSENSO (V _H I)	PROTOCOLO DE HUMANIZACIÓN		MC3 HUMANIZADO
			MURINO RETENIDO	HUMANIZADO	
87	Y	Y	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	Y
88	C	C	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	C
89	Q	Q	SÍ (CDR)	N/A	Q
90	Q	Q	SÍ (CDR)	N/A	Q
91	H	Y	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	H
92	Y	Y	SÍ (CDR)	N/A	Y
93	T	S	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	T
94	S	T	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	S
95	P	P	SÍ (CDR)	N/A	P
96	F	X	SÍ (CDR)	NO HUMANIZADO	F
97	T	T	SÍ (CDR)	N/A	T
98	F	F	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	F
99	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
100	S	Q	SÍ (CONT. INTERCADENA)	NO HUMANIZADO	S
101	G	G	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	G
102	T	T	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	T
103	N	K	NO	HUMANIZADO	K
104	L	V	NO	HUMANIZADO (BR)	V
105	E	E	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	E
106	I	I	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	I
107	K	K	SÍ (COMO HUMANO)	N/A	K

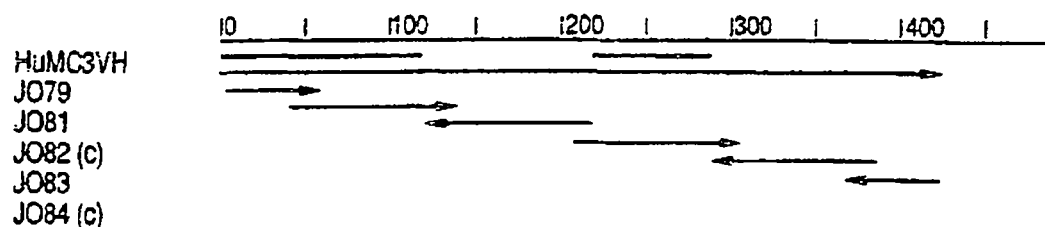
FIG. 13E

mkcsw vilfl lsgta gvhse vqlvq sgpev vkpga smkis ckasg ysftg 50
YTMH WVKQSP GMNLE WIGLI NPYNG GTVYN QKFQD KATLT VDKST GTAYM 100
ELSSL RSEDY AVYFC ARRWR YTMDY WQOGT LVTVS S 136

FIG. 14

mefqt qvfvf vflwl sgvdg DIVMT QSPDS MATSL GERVT ITCKA SQDVS 50
IGVAW YQQKP GQSPK LLIYS ASSRY TGVPD RFSGS GSGTD FTFTI SSVQA 100
EDLAV YYCQQ HYTSP FTFGS GTKLE IK 127

FIG. 15



SECUENCIA JO79

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GATATCCACC	ATGAAATGCA	GCTGGGTCAT	TCTCTTCCTC	CTGTCAGGAA	50
CTGCAGGT					58

SECUENCIA JO80

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GCTAGCTGAG	GAGACGGTGA	CCAGGGTTCC	TTBACCCCAA	TAGTCCATAG	50
TATATCT					57

SECUENCIA JO82

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TAAGTCCAAT	CCACTCAAGG	TTCATTCCAG	GGCTCTGCTT	CACCCAGTGC	50
ATGGTATAGC	CAGTGAATGA	GTAACCAGAA	GCCTTGCAAG	AGACCTTCAC	100

SECUENCIA JO83

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GATTGGACTT	ATTAATCCTT	ACAATGGTGG	TACTGTCTAC	AACCAGAAAGT	50
TCCAGGACAA	GGCCACATTA	ACTGTAGACA	AGTCAACGAG	CACAGCCTAC	100

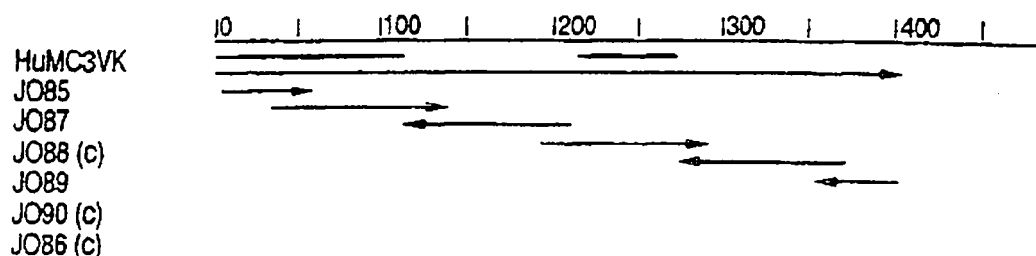
SECUENCIA JO84

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CAATAGTCCA	TAGTATATCT	CCAACGTCTT	GCACAGAAAT	AGACTGCCGT	50
GTCCCTCAGAT	CTCAGACTGC	TGAGCTCCAT	GTAGGCTGTG	CTCGTTGACT	100

SECUENCIA JO81

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TCCTGTCAAG	AACTGCAGGT	GTCCACTCTG	AGGTCCAGCT	GGTGCAGTCT	50
CGAGCTGAGG	TGAAGAAGCC	TGGAGCTTCA	GTGAAGGTCT	CCTGCAAGGC	100

FIG. 16



SECUENCIA JO85

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GATATCCACC	ATGGAGTTCC	AGACCCAGGT	CTTTGTATTTC	GTGTTTCTCT	50
GG					52

SECUENCIA JO86

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
gtcgcactTAC	GTTTTATTTC	CACCTTTGTC	CCCGAGCCGA	ACGTGAATGG	50

SECUENCIA JO87

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TTGTATTTCGT	GTTTCTCTGG	TTGTCTGGTG	TTGACGGAGA	CATTGTGATG	50
ACCCAGTCTC	CAGACTCCCT	GGCTGTGTCA	CTGGGAGAGA	GGGCCACCAT	100

SECUENCIA JO88

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TCAGCAGTTT	AGGAGATTGT	CCTGGTTTCT	GTTGATACCA	GGCTACACCA	50
ATACTCACAT	CCTGACTGGC	CTTGCAAGTG	ATGGTGGCCC	TCTCTCCCAG	100

SECUENCIA JO89

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACAATCTCCT	AAACTGCTGA	TTTACTCGGC	ATCCTCCCGG	TACACTGGAG	50
TCCCTGATCG	CTTCAGTGGC	AGTGGATCTG	GGACGGATTT	CACTCTCACC	100

SECUENCIA JO90

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CCCGAGCCGA	ACGTGAATGG	AGAAGTATAA	TGTTGCTGAC	AGTAATAAAC	50
TGCCACGTCT	TCAGCCTGCA	GACTGCTGAT	GGTGAGAGTG	AAATCCGTCC	100

FIG. 17

...g ata tcc acc atg aaa tgc agc tgg gtc att ctc ttc ctc ctg tca gga 49
act gca ggt gtc cac tct gag gtc cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg 100
aag aag cct gga gct tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac tca 151
ttc act ggc tat acc atg cac tgg gtg aag cag agc cct gga atg aac ctt 202
gag tgg att gga ctt att aat cct tac aat ggt ggt act gtc tac aac cag 253
aag ttc cag gac aag gcc aca tta act gta gac aag tca acg agc aca gcc 304
tac atg gag ctc agc agt ctg aga tct gag gac acg gca gtc tat ttc tgt 355
gca aga cgt tgg aga tat act atg gac tat tgg ggt caa gga acc ctg gtc 406
acc gtc tcc tca gct agc 424

FIG. 18A

MKCSW	VILFL	LSGTA	GVHSE	VQLVQ	SGAEV	KKPGA	SVKVS	CKASG	YSFTG	50
YTMHW	VKQSP	GMNLE	WIGLI	NPYNG	GTVYN	QKFQD	KATLT	VDKST	STAYM	100
ELSSL	RSEDY	AVYFC	ARRWR	YTMDY	WGQGT	LVTVS	S			136

FIG. 18B

--g ata tcc acc ATG GAG TTC CAG ACC CAG GTC TTT GTA TTC GTG TTT CTC 49
TGG TTG TCT GGT GTT GAC GGA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC 100
CTG GCT GTG TCA CTG GGA GAG AGG GCC ACC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG 151
GAT GTG AGT ATT GGT GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT 202
AAA CTG CTG ATT TAC TCG GCA TCC TCC CGG TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC 253
TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACG GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG 304
CAG GCT GAA GAC GTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA CAT TAT ACT TCT CCA 355
TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG GTG GAA ATA AAA cgt aag tcg ac 404

FIG. 19A

MEFQT QVFVF VFLWL SGVDG DIVMT QSPDS LAVSL GERAT ITCKA SQDVS	50
IGVAW YQQKP GQSPK LLIYS ASSRY TGVPO RFGS GSGTD FTLTI SSLQA	100
EDVAV YYCQQ HYTSP FTFGS GTKVE IK	127

FIG. 19B

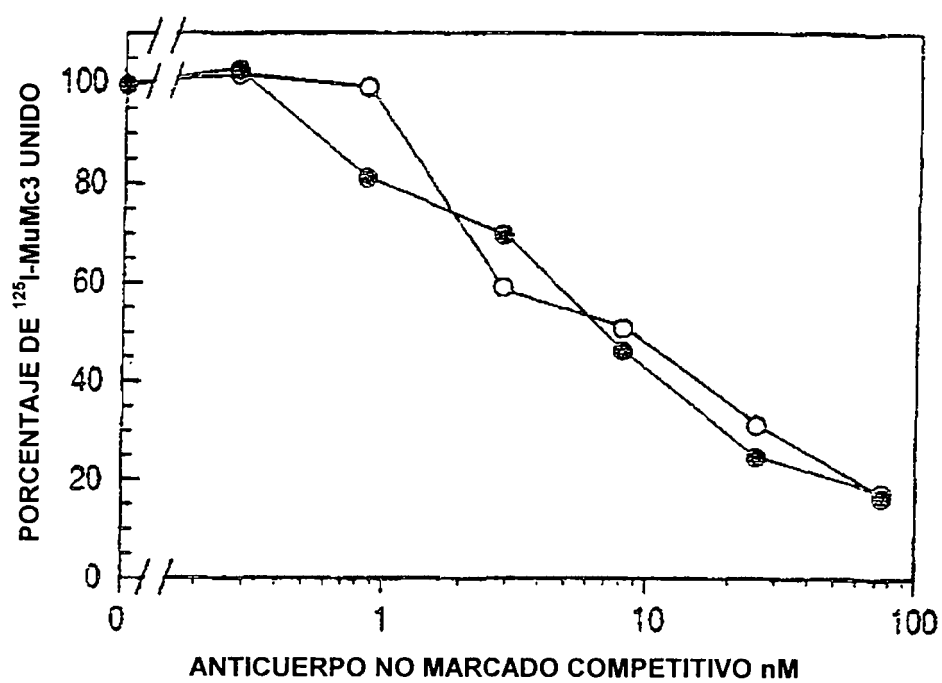


FIG. 20

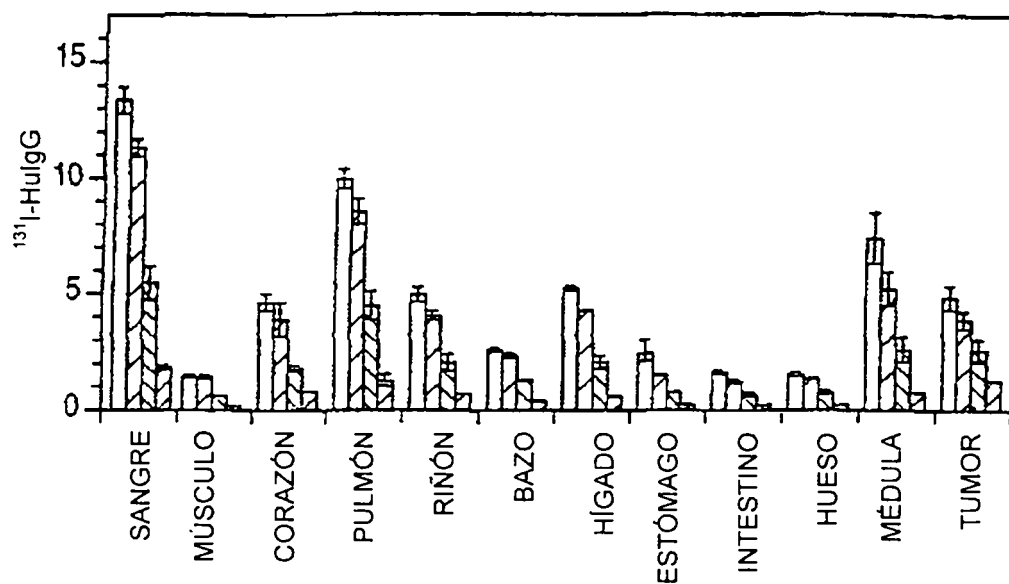


FIG. 21A

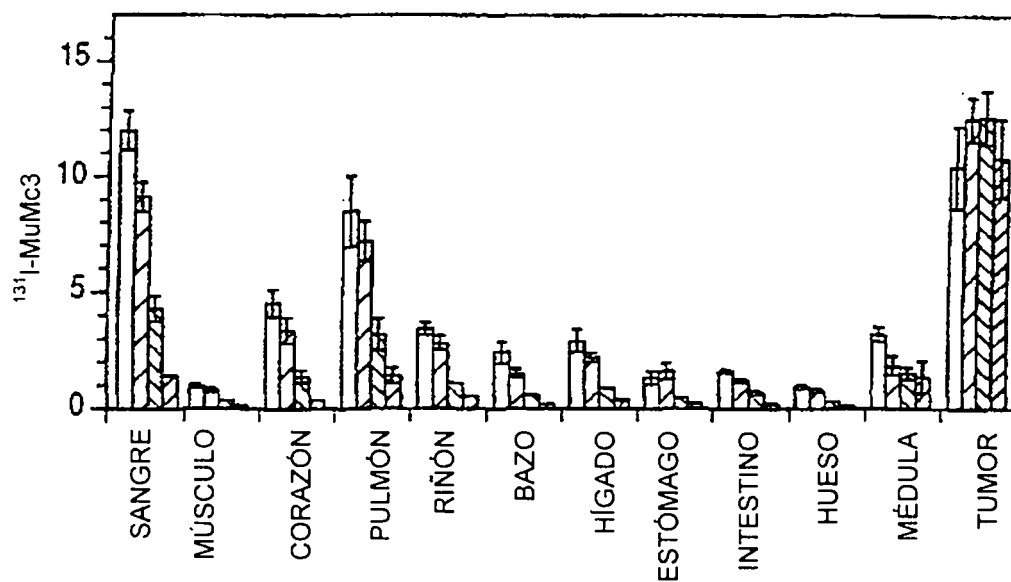


FIG. 21B

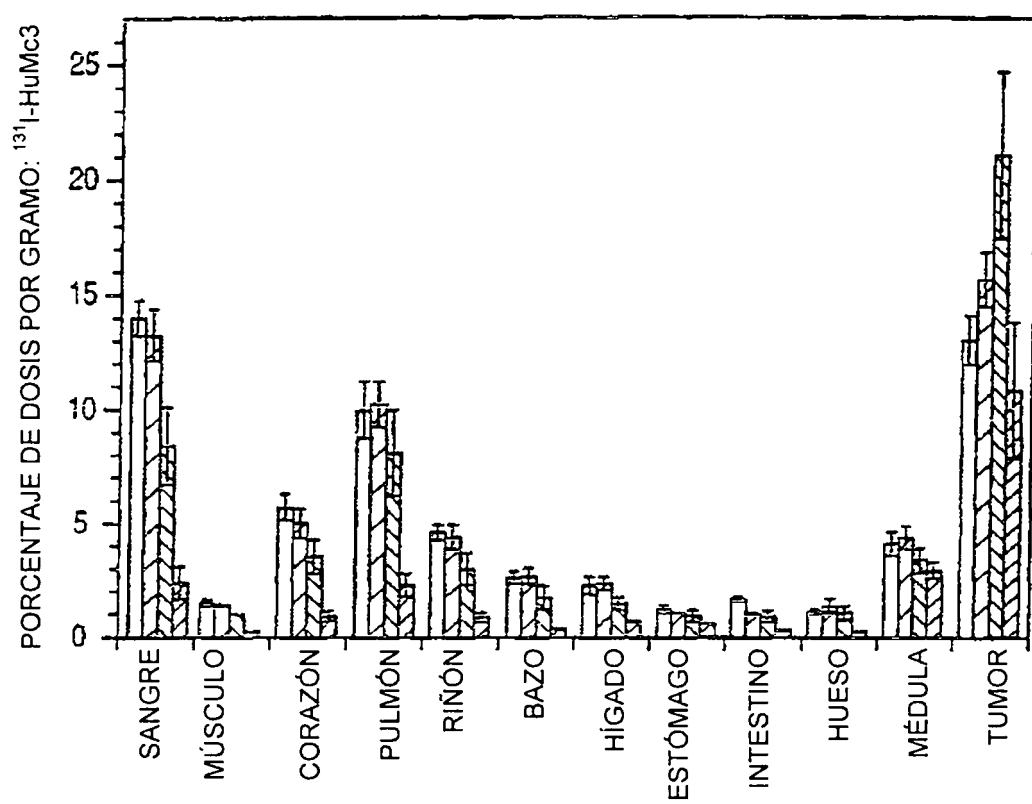


FIG. 21C

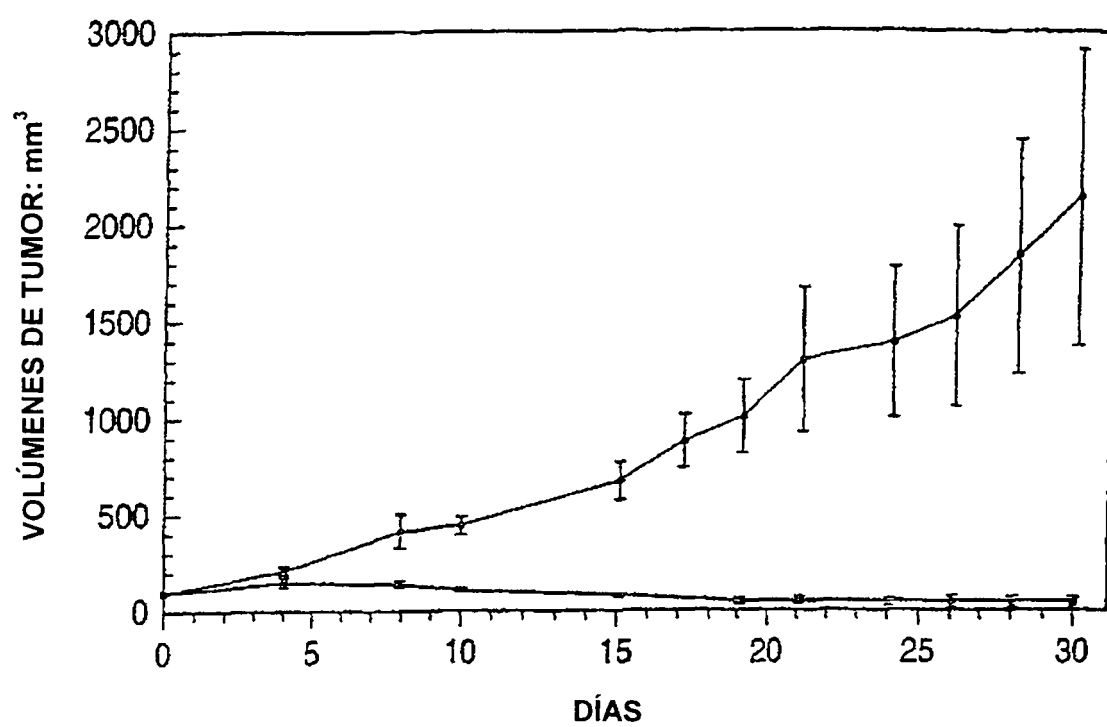
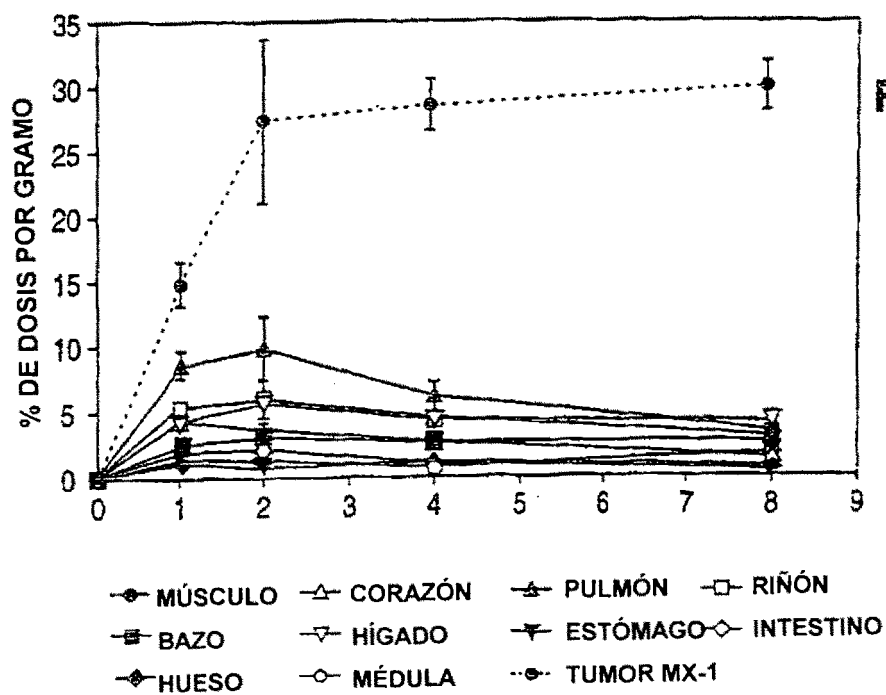
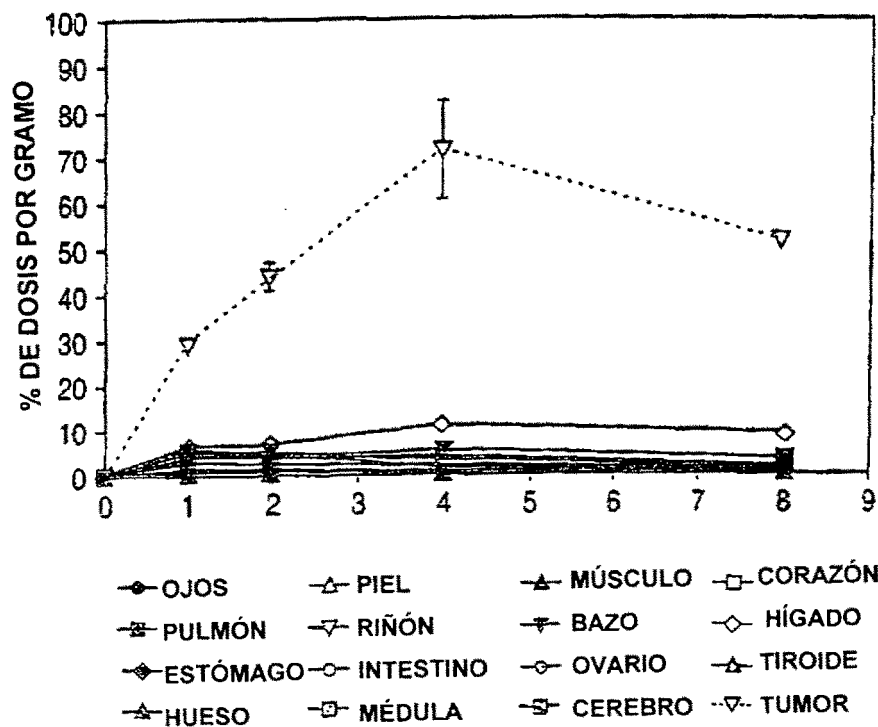


FIG. 22



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: CANCER RESEARCH FUND OF CONTRA COSTA
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: PÉPTIDOS RECOMBINANTES DERIVADOS DEL ANTICUERPO ANTI-BA46 Mc3, SUS MÉTODOS DE USO Y MÉTODOS PARA HUMANIZAR PÉPTIDOS DE ANTICUERPO
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 75
- (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: MORRISON & FOERSTER
- 15 (B) CALLE: 755 Page Mill Road
- (C) CIUDAD: Palo Alto
- (D) ESTADO: CALIFORNIA
- 20 (E) PAÍS: EE.UU.
- (F) CP: 94304-1018
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release N° 1.0, Version N° 1.25
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US95/11683
- (B) FECHA DE ENTRADA: 14-SEP-1995
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: DYLAN, TYLER
- 40 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 37.612
- (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: 27633-20001.40
- (ix) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIÓN:
- 45 (A) TELÉFONO: (415) 813-5600
- (B) FAX: (415) 494-0792
- (C) TELEX: 706141

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 29 aminoácidos
- 55 (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:
- Glu Ile Leu Gln Thr Ala Val Ile Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
- 1 5 10 15
- Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Pro Trp Ile Tyr
- 20 25

ES 2 293 642 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Leu Val Val Met Cys Lys Ser Ser Gln Ser
1           5           10           15
Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
                20           25           30
Pro Pro Leu Leu Ile Tyr
                35

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

```

Asp Ile Val Leu Gln Leu Val Val Leu Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
1           5           10           15
Gly Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Leu Leu Ile Lys
                20           25           30

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

```

Asp Ile Val Leu Gln Met Ala Val Met Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
1           5           10           15
Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Arg Trp Ile Tyr
                20           25           30

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

ES 2 293 642 T3

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

5

Ile Gln Met Thr Gln Leu Ala Val Ile Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile

1 5 10 15

10

Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Lys Leu Leu Val Tyr

20 25 30

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 aminoácidos

20

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

Asp Val Val Met Thr Gln Leu Val Ala Ile Cys Arg Ser Ser Gln Ser

1 5 10 15

30

Leu Val His Ser Gln Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Pro

20 25 30

35

Lys Val Leu Ile Tyr

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

45

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

50

Asp Ile Gln Met Gln Leu Ala Val Ile Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile

1 5 10 15

55

Asn Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Leu Leu Ile Tyr

20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

65

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 293 642 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

	Val Leu Met Gln Thr Leu Val Ala Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Thr
5	1 5 10 15
	Ile Leu Leu Ser Asp Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Ser
	20 25 30
10	Pro Leu Leu Ile Tyr
	35

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

	Asp Ile Met Gln Leu Ala Val Ile Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His
30	1 5 10 15
	Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Leu Leu Val Tyr
	20 25 30

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

	Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Val Arg Phe Tyr Leu Ile Met Asp Ala
50	1 5 10 15
	Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Tyr Pro Leu Ile Thr Phe Thr Leu Leu
	20 25 30

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

ES 2 293 642 T3

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Val Asp Arg Phe Ser Thr Asp Phe Leu
 1 5 10 15
 5 Ile Val Asp Ala Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr
 20 25 30
 Phe Ala Thr Leu Ile
 10 35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 33 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CATENARIEDAD: sencilla
 20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 40 (C) CATENARIEDAD: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Val Arg Phe Tyr Leu Ile Met Asp Ala
 45 1 5 10 15
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Gly Arg Asn Pro Thr Phe Thr Leu Ile
 20 25 30
 50

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 32 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CATENARIEDAD: sencilla
 60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Val Arg Phe Asp Tyr Leu Ile Leu Asp
 65 1 5 10 15
 Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Thr Pro Arg Thr Phe Thr Leu
 20 25 30

ES 2 293 642 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Val Asp Arg Phe Thr Phe Leu Ile Val
1 5 10 15
Asp Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Thr Leu
20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

ES 2 293 642 T3

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

5

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

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 24 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

25

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

30

Val Leu Glu Val Leu Leu Cys Ala Phe Asp Phe Lys Tyr Trp Met Ser
1 5 10 15
Trp Val Arg Gln Leu Glu Trp Ile
20

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 26 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

45

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

50

Val Leu Glu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Phe Asp Phe Tyr Met Glu
1 5 10 15
Trp Val Arg Gln Arg Leu Glu Trp Ile Ala
20 25

55

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60

(A) LONGITUD: 26 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 293 642 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:21:

Val Leu Glu Pro Val Leu Leu Cys Val Asp Ile Thr Ser Asp Tyr Trp
1 5 10 15
Ser Trp Ile Arg Lys Asn Leu Glu Tyr Met
20 25

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

Leu Gln Met Val Ile Cys Ala Tyr Thr Phe Asp Tyr Trp Ile Glu Trp
1 5 10 15
Val Lys Gln Arg Leu Glu Trp Ile
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:23:

Val Leu Glu Val Val Met Cys Ala Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Val
1 5 10 15
Asn Trp Val Lys Gln Gln Glu Trp Ile
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:24:

Leu Glu Val Met Leu Cys Ala Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn
1 5 10 15
Trp Val Arg Gln Ser Leu Glu Trp Val Ala
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:25:

ES 2 293 642 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:25:

```

Glu Val Leu Gln Val Val Met Cys Ala Tyr Thr Phe Ser Asn Gly Ile
 1           5           10           15
Asn Trp Val Lys Gln Leu Glu Trp Ile
          20           25

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:26:

```

Val Leu Glu Val Leu Leu Cys Ala Phe Thr Phe Arg Cys Ala Met Ser
 1           5           10           15
Trp Val Arg Gln Lys Leu Trp Val Ala
          20           25

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:27:

```

Val Leu Glu Val Leu Ile Cys Val Phe Leu Gly Tyr Gly Val Asn Trp
 1           5           10           15
Val Arg Gln Leu Glu Trp Leu
          20

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 293 642 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:28:

```

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

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEO ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:29:

```

Ala Ser Arg Asn Lys Gly Asn Lys Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1           5           10           15
30 Val Lys Gly Arg Phe Ile Val Arg Thr Leu Leu Met Leu Asp Ala Tyr
           20           25           30
Tyr Cys Ala Arg
35           35

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEO ID NO:30:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 30 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 45 (C) CATENARIEDAD: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:30:

50 Tyr Val Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
Arg Ile Ile Arg Tyr Leu Leu Val Asp Ala Tyr Tyr Cys Asn
55 20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 293 642 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:31:

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr His Glu Arg Phe Lys
5 1 5 10 15
Gly Lys Ala Phe Ala Ala Met Leu Leu Asp Tyr Tyr Cys Leu His
 20 25 30

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (B) LONGITUD: 31 aminoácidos
(C) TIPO: aminoácido
(C) CATENARIEDAD: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: S1Q ID KO:32:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:33:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CATENARIEDAD: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:33:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:34:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CATENARIEDAD: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:34:

ES 2 293 642 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEQ ID NO:35:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:36:

Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
Arg Leu Ile Lys Val Leu Met Leu Asp Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:37:

Leu His Tyr Tyr Gly Tyr Asn Ala Tyr Trp Gln Thr Val Val
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

ES 2 293 642 T3

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:38:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:39:

Trp Asp Gly Asp Tyr Trp Val Val
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:40:

Gly Asn Tyr Asp Phe Asp Gly Trp Thr Leu Val
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:41:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

ES 2 293 642 T3

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:42:

Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Thr Val Val

1

5

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:43:

Ser Glu Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Thr Leu Val

1

5

10

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:44:

Tyr Ser Ser Asp Pro Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Thr Leu Val

1

5

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:45:

Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Thr Leu Val

1

5

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 409 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

ES 2 293 642 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..408

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:46:

10	ATG AAA TGC AGC TGG GTC ATT CTC TTC CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGT	48
	Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
	1 5 10 15	
15	GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG CAA CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG	96
	Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
	20 25 30	
20	CCT GGA GCT TCA ATG AAG ATA TCC TGC GAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC	144
	Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
	35 40 45	
25	ACT GGC TAT ACC ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA ATG AAC CTT	192
	Thr Gly Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Met Asn Leu	
	50 55 60	
30	GAG TGG ATT GGA CTT ATT AAT CCT TAC AAT GGT GGT ACT GTC TAC AAC	240
	Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Val Tyr Asn	
	65 70 75 80	
35	CAG AAG TTC CAG GAC AAG GCC ACA TTA ACT GTA GAC AAG TCA TCC GGC	288
	Gln Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Gly	
	85 90 95	
40	ACA GCC TAC ATG GAG CTC CTC AGT CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC	336
	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
	100 105 110	
45	TAT TTC TGT GCA AGA CGT TGG AGA TAT ACT ATG GAC TAT TGG GGT CAA	384
	Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Trp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
	115 120 125	
50		
	GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA G	409
	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
55	130 135	

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 136 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

ES 2 293 642 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:47:

```

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

```

35
(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 382 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- 45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- 50 (B) LOCALIZACIÓN: 1..381

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:48:

```

      ATG GAG TTC CAG ACC CAG GTC TTT GTA TTC GTG TTT CTC TGG TTG TCT      48
55     Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
      1              5              10              15
      GGT GTT GAC GGA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAC AAA TTC ATG TCC      96
60     Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
              20              25              30

```

65

ES 2 293 642 T3

	ACA TCA GAG GGA GAC TGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT	144
	Thr Ser Glu Gly Asp Trp Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
5	35 40 45	
	GTG AGT ATT GGT GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT	192
	Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro	
10	50 55 60	
	AAA CTG CTG ATT TAC TCG GCA TCC TCC CGG TAC ACT GGA GTC CCT GAT	240
	Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp	
15	65 70 75 80	
	CGC TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACG GAT TTC ACT TTC ACC ATC AGC	288
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser	
20	85 90 95	
	AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA CAT TAT	336
	Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr	
25	100 105 110	
	ACT TCT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAC TTG GAA ATA AAA	381
	Thr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys	
30	115 120 125	
	C	382

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 127 aminoácidos

40 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:49:

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

ES 2 293 642 T3

	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser	85	90	95
5	Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr	100	105	110
	Thr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys			
10		115	120	125

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:50:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 58 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- 20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:50:

25 **GATATCCACC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT TCTCTTCCTC CTGTCAGGAA CTGCAGGT** 58

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:51:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- 35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:51:

40 **GCTAGCTGAG GAGACGGTGA CCAGGGTTCC TTGACCCCAA TAGTCCATAG TATATCT** 57

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:52:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 100 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:52:

55 **TAAGTCCAAT CCACTCAAGG TTCATTCCAG GGCTCTGCTT CACCCAGTGC ATGGTATAGC** 60

CAGTGAATGA GTAACCAGAA GCCTTGCCAGG AGACCTTCAC 100

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:53:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 100 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 65 (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 293 642 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:53:

GATTGGACTT ATTAATCCTT ACAATGGTGG TACTGTCTAC AACCAGAAAGT TCCAGGACAA 60
GGCCACATTA ACTGTAGACA AGTCAACGAG CACAGCCTAC 100

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 100 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:54:

CAATAGTCCA TAGTATATCT CCAACGTCTT GCACAGAAAT AGACTGCCGT GTCCTCAGAT 60
CTCAGACTGC TGAGCTCCAT GTAGGCTGTG CTCGTTGACT 100

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 100 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:55:

TCCTGTCAGG AACTGCAGGT GTCCACTCTG AGGTCCAGCT GGTGCAGTCT GGAGCTGAGG 60
TGAAGAAGCC TGGAGCTTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC 100

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 52 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:56:

GATATCCACC ATGGAGTTCC AGACCCAGGT CTTTGTATTTC GTGTTTCTCT GG 52

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:57:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 50 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:57:

GTCGACTTAC GTTTTATTTC CACCTTTGTC CCCGAGCCGA ACGTGAATGG 50

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:58:

ES 2 293 642 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 100 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LÑA SECUENCIA: SEQ ID NO:58:

TTGTATTTCGT GTTCTCTGG TTGTCTGGTG TTGACGGAGA CATTGTGATG ACCCAGTCTC 60

CAGACTCCCT GGCTGTGTCA CTGGGAGAGA GGGCCACCAT 100

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 100 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:59:

TCAGCAGTTT AGGAGATTGT CCTGGTTTCT GTTGATACCA GGCTACACCA ATACTCACAT 60

CCTGACTGGC CTTGCAGGTG ATGGTGGCCC TCTCTCCAG 100

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 100 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:60:

ACAATCTCCT AAAGTGCTGA TTTACTCGGC ATCCTCCCGG TACTGAGAG TCCCTGATCG 60

CTTCACTGGC AGTGGATCTG GGACGGATTT CACTCTCACC 100

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:61:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 100 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:61:

CCCCAGCCGA ACGTGAATGG AGAAGTATAA TGTTGCTGAC AGTAATAAAC TGCCACGTCT 60

TCAGCCTGCA GACTGCTGAT GGTGAGAGTG AAATCCGTCC 100

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:62:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 424 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 293 642 T3

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:62:

```

5      GATATCCACC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT TCTCTTCCTC CTGTCAGGAA CTGCAGGTGT      60
      CCACTCTGAG GTCCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GAGCTTCAGT      120
10     GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGTTACTC ATTCACTGGC TATACCATGC ACTGGGTGAA      180
      GCAGAGCCCT GGAATGAACC TTGAGTGGAT TGGACTTATT AATCCTTACA ATGGTGGTAC      240
15     TGTCTACAAC CAGAAGTTCC AGGACAAGGC CACATTAACT GTAGACAAGT CAACGAGCAC      300
      AGCCTACATG GAGCTCAGCA GTCTGAGATC TGAGGACACG GCAGTCTATT TCTGTGCAAG      360
20     ACGTTGGAGA TATACTATGG ACTATTGGGG TCAAGGAACC CTGGTCACCG TCTCCTCAGC      420
      TAGC                                          424

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:63:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 136 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:63:

```

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

```

ES 2 293 642 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:64:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 402 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:64:

```

GATATCCACC ATGGAGTTCC AGACCCAGGT CTTTGTATTC GTGTTTCTCT GGTGTCTGG      60
TGTTGACGGA GACATTGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT CACTGGGAGA      120
GAGGGCCACC ATCACCTGCA AGGCCAGTCA GGATGTGAGT ATTGGTGTAG CCTGGTATCA      180
ACAGAAACCA GGACAATCTC CTAAACTGCT GATTTACTCG GCATCCTCCC GGTACACTGG      240
AGTCCCTGAT CGCTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACGGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG      300
TCTGCAGGCT GAAGACGTGG CAGTTTATTA CTGTCAGCAA CATTATACTT CTCCATTAC      360
GTTCGGCTCG GGGACAAAGG TGGAAATAAA ACGTAAGTCG AC                        402
  
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:65:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 127 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:65:

```

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

ES 2 293 642 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEO ID NO:66:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CATENARIEDAD: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:66:

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Lys Val Asp

1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:67:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CTENARIEDAD: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:67:

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:68:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CATENARIEDAD: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:68:

ATGAAATGCA GCTGGGTCAT TCTCTTCCTC CTGTCAGGAA CTGCAGGTGT CCACTCT 57

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:69:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CATENARIEDAD: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:69:

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser

ES 2 293 642 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:70:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 60 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:70:

ATGGAGTTCC AGACCCAGGT CTTTGTATTC GTGTTTCTCT GGTGTCTGG TGTGACGGA 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:71:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:71:

Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser

1 5 10 15

Gly Val Asp Gly

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:72:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:72:

GTCGACTTAC GTTTTATTTT CAAGTTTGTC CCGAGGCC 38

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:73:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 29 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:73:

GCTAGCTGAG GAGACGGTGA CTGAGGTTC 29

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:74:

ES 2 293 642 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:74:

GATATCCACC ATGGAGTTCC AGACCCAGGT CTTTGTATT

39

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:75:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:75:

GTTAACCACC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT TCTCTT

36