

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21 EXPEDIENTE No

06-34941

54 TITULO

ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA EL 4-1BB HUMANO (CD137)

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL

CO7K16/28, 16/30, A61K39/395
CO7H21/04, A61P35/00

71 SOLICITANTE

BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY

DOMICILIO

PRINCETON NEW JERSEY ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74 APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22 SANTAFE DE BOGOTA, D C

5

PETITORIO

AS 100 749



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 08-034841 -00000-0000 Fec: 2006-04-10 18:08:40
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTEYII Eje 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 230

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

10-05-2006

1

SOLICITUD DE

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY
Dirección P O Box 4000 Route 206 and Province
Line Road Princeton NJ 08543-4000 Estados Unidos
de América
Nacionalidad o Domicilio Estados Unidos
Lugar de Constitución Estados Unidos
Teléfono: Fax
E-mail

IDENTIFICACION

CC ☐ NIT ☐

CE ☐ Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección Cra 7 No 16-56 Piso 9

Teléfono 380-2200 Fax. 380-2700

E-mail

IDENTIFICACION

CC ☒ NIT ☐

CE ☐ Otro ☐

Cual

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre María Jure-Kunkel, Laura J Hefta, Marc Santoro Subinay Ganguly Edward L. Halk

Dirección 31 Silvers Lane, Plainsboro, NJ 08536 US 18 Park Avenue, Pennington NJ 08534 US,
149 North Main St. Yardley PA 19087 US, 7 Thornbury Lane Newtown PA 18940 US 1004
Edmonds Court, Sunnyvale CA 94087 Estados Unidos de América (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (88)

Solicitud Internacional No PCT/US2004/033587 Fecha 12-10-2004

Publicación Internacional No WO 2005/035584 A1 Fecha 21-04-2005

Título (54): ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA EL 4-1BB HUMANO (CD137)

7 Clasificación Internacional (51) C07K16/28, 16/30, A61K39/395, C07H21/04

A61P35/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de
Origen

US

US

(32) Fecha

10-10-2003

08-10-2004

(31) Número de Solicitud

60/510.193

10/961.567

9 Comprobante de pago No. 06-11.551

Fecha 07-04-2006

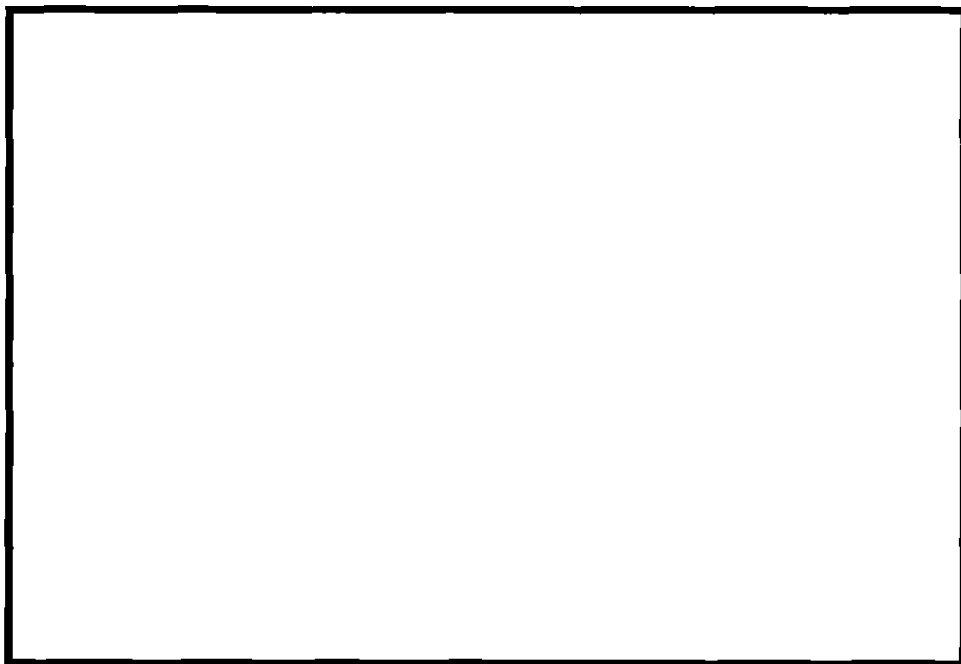
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud \$463 000
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes al fuere el caso Fotocopia autenticada
- ☐ Documento de cesión del Inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen descripción reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen descripción reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ Otros Tarjeta de Propietarios

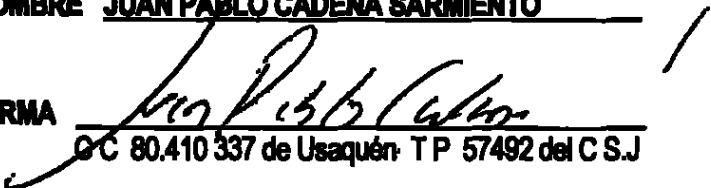
11 FIGURA CARACTERÍSTICA.



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA


OC 80.410 337 de Usaquén T P 57492 del C S.J

Instrucciones para la presentación de los anexos ver reverso de esta página.

31

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-034841 -00000-0000 Fec: 2006-04-10 18:08:40
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTEYII Evt 378 FASENACIONALJ
Act 411 PRESENTACION Folios. 290

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT 800176089 2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 06 11,551
FECHA FEBRERO 10 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

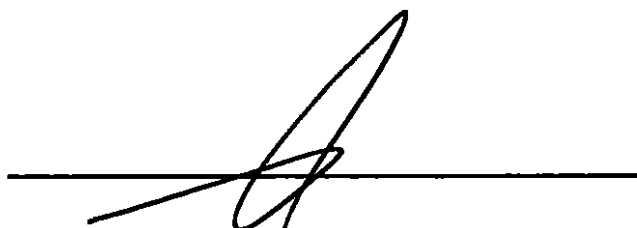
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050 00110-6	45025821	10/02/2006	36,630,000 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01 01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	463 000 00
		TOTAL	\$ 463,000 00

SOM CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

FOLD 4
TRANSFER

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To

GOLIAN Paul D
Bristol-Myers Squibb Company
P O Box 4000
Princeton NJ 08543-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

100 744

Ney

Date of mailing (day/month/year)
26 January 2006 (26 01 2006)Applicant's or agent's file reference
10060 PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No
PCT/US2004/033587International filing date (day/month/year)
12 October 2004 (12 10 2004)Priority date (day/month/year)
10 October 2003 (10 10 2003)

Applicant

BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY et al

The International Bureau transmits herewith the following documents.

- ☐ copy of the international application as published by the International Bureau on under
No WO
- ☒ copy of international application as republished by the International Bureau on 26 January 2006 (26.01 2006) under
No WO 2005/035584
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15) (48)
or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

**RECEIVED
BMS PATENT LAW**

FEB 02 2006

Docketed Item _____
Due Date _____
Attorney _____ The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1111 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Beate Giffo Schmitt

Facsimile No +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 87 20

AS 100749
S

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 April 2005 (21.04.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/035584 A1

(51) International Patent Classification⁷ C07K 16/28
(21) International Application Number-
PCT/US2004/033587

(22) International Filing Date: 12 October 2004 (1 10.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data
60/510,193 10 October 2003 (10.10 .003) US
10/961,567 8 October 2004 (08 10.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US)- BRIS
TOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US] Route
.06 and Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000
(US).

(72) Inventors, and

(75) Inventors/Applicants (fo US only)- JURE-KUNKEL,
Maria [UY/US] 31 Silvers Lane, Plainsboro, NJ 08536
(US). HEFTA, Laura, J [US/US] 18 Park Avenue,
Pennington NJ 08534 (US). SANTORO, Marc [US/US]
149 North Main St. Yardley PA 19067 (US) GANGULY
Subhasy [IN/US] 7 Thornbury Lane, Newtown, PA 18940
(US). HALK, Edward, L. [-/US] 1004 Edmonds Court,
Sunnyvale CA 94087 (US)

(74) Agents GOLIAN Paul, D et al Bristol Myers Squibb
Company P O Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available) AE, AG AL, AM
AT AU AZ, BA BB BG BR, BW BY BZ, CA, CH CN
CO CR, CU CZ, DE, DK, DM DZ, EC, EE, EG ES FI,
GB GD GE, GH GM, HR, HU ID IL, IN IS JP KE,
KG KP KR KZ, LC, LK, LR, LS LT LU LV MA MD,
MG MK, MN MW MX MZ, NA NI NO NZ, OM PG
PH PL, PT RO, RU SC, SD SE, SG SK, SL, SY TJ TM
TN TR TT TZ, UA, UG US UZ, VC VN YU ZA ZM
ZW

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available) ARIPO (BW GH,
GM KE, LS MW MZ, NA SD SL, SZ, TZ, UG ZM,
ZW), Buranan (AM, AZ, BY KG KZ, MD RU TJ TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB GR, HU IE, IT LU MC, NL, PL, PT RO SE,
SI SK, TR) OAPI (BF BJ CF CG CI, CM GA GN
GQ GW ML, MR, NE, SN TD TG).

Declarations under Rule 4.17

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4 17(ii)) for the following designations AE
AG AL, AM AT AU AZ, BA, BB BG BR, BW BY BZ,
CA CH CN CO CR, CU CZ, DE, DK DM DZ, EC EE,
EG ES, FI GB GD GE, GH GM HR, HU ID IL, IN IS
JP KE, KG KP KR, KZ, LC LK LR LS LT LU LV MA
MD, MG MK, MN MW MX MZ, NA NI NO NZ, OM
PG PH PL, PT RO RU SC SD SE, SG SK SL, SY TJ
TM TN TR, TT TZ, UA UG UZ, VC VN YU ZA, ZM
ZW ARIPO patent (BW GH GM KE, LS, MW MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG ZM ZW), Eurasian patent (AM AZ,
BY KG KZ, MD, RU TJ TM), European patent (AT BE,
BG CH CY CZ, DE, DK EE, ES, FI FR GB, GR HU IE,
IT LU MC NL, PL, PT RO SE, SI SK TR), OAPI patent
(BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ, GW ML, MR NE,
SN TD TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4 17(iii)) for all designations

Published.

— with international search report

(48) Date of publication of this corrected version
26 January 2006

(15) Information about Correction
see PCT Gazette No 04/2006 of 6 January .006, Sec
tion II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title FULLY HUMAN ANTIBODIES AGAINST HUMAN 4-1BB (CD137)

(57) Abstract: Fully human antibodies and antigen binding portions thereof that bind to human 4-1BB and that allow binding of
human 4-1BB to a human 4-1BB ligand. In one aspect, the antibody is an IgG4 antibody Also provided is a method for treating a
disease in a subject comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody to said subject.

WO 2005/035584 A1

From the INTERNATIONAL BUREAU

-10060 - WO - PCT
Scholar 6

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To

GOLIAN Paul D
Bristol-Myers Squibb Company
P O Box 4000
Princeton NJ 08543-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Mud

Date of mailing (day/month/year)
21 April 2005 (21 04 2005)Applicant's or agent's file reference
10060 PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No
PCT/US2004/033587International filing date (day/month/year)
12 October 2004 (12 10 2004)Priority date (day/month/year)
10 October 2003 (10 10 2003)

Applicant

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY# et al

The International Bureau transmits herewith the following documents

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 1 April 2005 (21.04.2005) under No WO 2005/035584
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No WO
- For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15) (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

RECEIVED
BMS PATENT LAW

APR 27 2005

Docketed Item _____
Due Date _____
Attorney _____The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Beate Giffö Schmitt

Facsimile No +41 22 740 14 35

Facsimile No +41 22 338 87 20

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 April 2005 (21.04.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/035584 A1

(51) International Patent Classification⁷ C07K 16/28

Subsiny [IN/US] 7 Thornbury Lane, Newtown PA 18940 (US).

(21) International Application Number⁷
PCT/US2004/033587

(74) Agents: GOLIAN, Paul, D. et al Bristol Myers Squibb Company P O Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(22) International Filing Date 1 October 2004 (12.10 2004)

(25) Filing Language. English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data.
60/510 193 10 October 2003 (10.10 2003) US
10/961,567 8 October 2004 (08 10 2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US) BRIS
TOL-MYERS SQUIBB COMPANY? [US/US] Route
206 and Province Lane Road, Princeton NJ 08543-4000
(US).

(72) Inventors, and

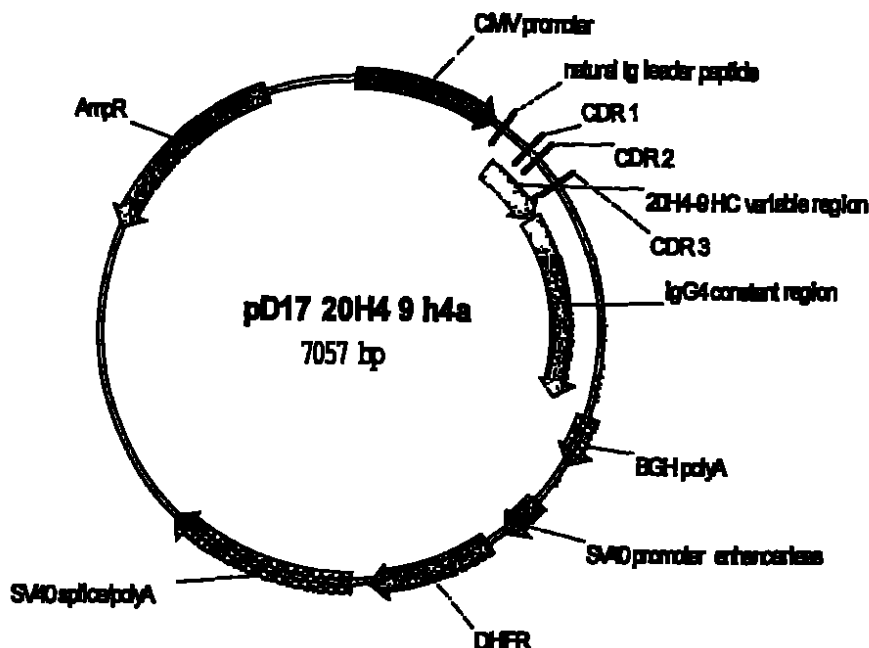
(75) Inventors/Applicants (for US only): JURE-KUNKEL,
Maria [UY/US] 31 Silvers Lane, Plainsboro NJ 08536
(US). HEFTA, Laura, J [US/US] 18 Park Avenue,
Pennington NJ 08534 (US) SANTORO Marc [US/US]
149 North Main St. Yardley PA 19067 (US) GANGULY

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available) AE, AG AL AM,
AT AU AZ, BA BB BG BR, BW BY BZ, CA CH CN
CO CR, CU CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG ES, FI,
GB GD GE, GH, GM HR, HU ID IL, IN IS, JP KE,
KG KP KR, KZ, LC LK, LR, LS LT LU LV MA, MD
MG MK, MN MW MX, MZ, NA, NI, NO NZ, OM PG
PH PL, PT RO RU SC SD SE, SG SK, SL, SY TJ TM
TN TR, TT TZ, UA, UG US, UZ, VC, VN YU ZA, ZM
ZW

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available) ARIPO (BW GH,
GM KE, LS MW MZ, NA, SD SL, SZ, TZ, UG ZM,
ZW), Eurasian (AM AZ, BY KG KZ, MD RU TJ TM),
European (AT BE, BG CH, CY, CZ, DE, DK EE, ES, FI,
FR, GB GR, HU IE, IT LU MC, NL, PL, PT RO, SE, SI,
SK, TR) OAPI (BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ,
GW ML, MR, NE, SN TD TG).

[Continued on next page]

(54) Title. FULLY HUMAN ANTIBODIES AGAINST HUMAN 4-1BB (CD137)



(57) Abstract: Fully human antibodies and antigen-binding portions thereof that bind to human 4-1BB and that allow binding of human 4-1BB to a human 4-1BB ligand. In one aspect, the antibody is an IgG4 antibody. Also provided is a method for treating a disease in a subject comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody to said subject.

**Declarations under Rule 4.17**

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BW BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NA NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG UZ VC VN YU ZA ZM ZW ARIPO patents (BW GH GM KE LS MW MZ NA SD SL SZ TZ UG ZM ZW) Eurasian patents (AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM) European patents (AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE

IT LU MC NL PL PT RO SE, SI, SK TR), OAPI patents (BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ, GW ML, MR NE SN TD TG)

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for all designations

Published

- with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations refer to the Guidance Notes on Codes and Abbreviations appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

87

FULLY HUMAN ANTIBODIES AGAINST HUMAN 4-1BB (CD137)

Field of the Invention.

The invention is directed to fully human antibodies and, more specifically to
5 fully human antibodies to human 4-1BB (CD137)

BACKGROUND OF THE INVENTION

An extensive body of evidence has unequivocally demonstrated that some
degree of immune response against cancer exists in humans and animals. In cancer
10 patients, cellular components of the immune system are able to recognize antigens
expressed by tumor cells, such as differentiation of oncofetal antigens or mutated
gene products (S Rosenberg, Nature 411 380-4 (2001) P van der Bruggen et al.,
Immunological Rev., 188 51-64 (2002)) A number of clinical studies have shown
that tumor-infiltrating lymphocytes have favorable prognostic significance (E. Halapi,
15 Med. Oncol 15(4).203 11 (1998) Y Nardo et al., Cancer Res., 58(16) 3491-4
(1998) L Zhang et al., N.E. J Med., 348(3) 203 13 (2003)) Furthermore, treatment
with immunomodulators, such as cytokines or bacterial products, cancer vaccines, or
adoptive immunotherapy has led to tumor regression in a number of patients (S
Rosenberg, Cancer J Sci. Am 6(S) 2 (2000) P Bassi, Surg Oncol., 11(1 2) 77-83
20 (2002) S Antonia et al., Current Opinion in Immunol., 16 130-6 (2004)) Despite
these responses, immunity against cancer frequently fails to effectively eliminate
tumor cells The causes for this failure can be grouped into three major categories.
(i) impaired tumor recognition by immune cells, either by variable expression of
tumor antigens or reduced expression of class I major histocompatibility complex
25 (MHC) (ii) immunosuppressive tumor microenvironment, as a result of secretion of
inhibitory cytokines by tumor cells (e.g. TGF β) and (iii) poor tumor
immunogenicity due to the lack of expression of co-stimulatory molecules on tumor
cells, which results in the inability of the tumor cells to effectively stimulate T-cells
Advances in our understanding of the requirements for tumor antigen recognition and
30 immune effector function indicate that a potential strategy to enhance an anti-tumor
immune response is to provide co-stimulation through an auxiliary molecule Tumor
antigen-specific T-cells require costimulation to initiate and maintain effector

functions. Thus, therapies that target costimulatory molecules can be applied to modulate and enhance the immune response to tumors.

The current model for T-cell activation postulates that naive T-cells require two signals for full activation. (i) a signal provided through the binding of processed antigens presented to the T-cell receptor by major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and (ii) an additional signal provided by the interaction of co-stimulatory molecules on the surface of T-cells and their ligands on antigen presenting cells. Recognition of an antigen by a naive T-cell is insufficient in itself to trigger T cell activation. Without a co-stimulatory signal, T-cells may be eliminated either by death or by induction of anergy. Signaling through the CD28 costimulatory molecule appears to be key for the initiation of T-cell responses. However, CD137 (4-1BB) signaling has been shown to be primordial for the maintenance and expansion of the immune response to antigens, as well as, for the generation of memory T-cells.

CD137 (4-1BB) is a member of the tumor necrosis receptor (TNF R) gene family which includes proteins involved in regulation of cell proliferation, differentiation, and programmed cell death. CD137 is a 30 kDa type I membrane glycoprotein expressed as a 55 kDa homodimer. The receptor was initially described in mice (B. Kwon et al., P.N.A.S. USA, 86 1963-7 (1989)), and later identified in humans (M. Alderson et al., Eur. J. Immunol., 24 2219-27 (1994); Z. Zhou et al., Immunol. Lett. 45 67 (1995)) (See, also Published PCT Applications WO95/07984 and WO96/29348 and U.S. Patent No. 6,569,997 hereby incorporated by reference (See, SEQ ID NO.2)). The human and murine forms of CD137 are 60% identical at the amino acid level. Conserved sequences occur in the cytoplasmic domain, as well as 5 other regions of the molecule, indicating that these residues might be important for function of the CD137 molecule (Z. Zhou et al. Immunol. Lett. 45 67 (1995)). Expression of CD137 has been shown to be predominantly on cells of lymphoid lineage such as activated T-cells, activated Natural Killer (NK) cells, NKT-cells, CD4CD25 regulatory T-cells, and also on activated thymocytes, and intraepithelial lymphocytes. In addition, CD137 has also been shown to be expressed on cells of myeloid origin like dendritic cells, monocytes, neutrophils, and eosinophils. Even though CD137 expression is mainly restricted to immune/inflammatory cells, there

have been reports describing its expression on endothelial cells associated with a small number of tissues from inflammatory sites and tumors

Functional activities of CD137 on T-cells have been amply characterized. Signaling through CD137 in the presence of suboptimal doses of anti-CD3 has been demonstrated to induce T-cell proliferation and cytokine synthesis (mainly IFN- γ) and to inhibit activated cell death. These effects have been observed with both murine and human T-cells (W Shuford et al., J Exp Med. 186(1) 47-55 (1997) D Vinay et al., Semin. Immunol., 10(6) 481-9 (1998) D Laderach et al., Int. Immunol. 14(10) 1155-67 (2002)) In both humans and mice, co-stimulation enhances effector functions, such as IFN- γ production and cytotoxicity by augmenting the numbers of antigen-specific and effector CD8⁺ T-cells. In the absence of anti-CD3 signaling, stimulation through CD137 does not alter T-cell function, indicating that CD137 is a co-stimulatory molecule.

The physiological events observed following CD137 stimulation on T-cells are mediated by NF κ B and PI3K/ERK1/2 signals with separate physiological functions. NF κ B signals trigger expression of Bcl- χ_L , an anti-apoptotic molecule, thus resulting in increased survival, whereas PI3K and ERK1/2 signals are specifically responsible for CD137-mediated cell cycle progression (H Lee et al., J Immunol., 169(9) 4882-8 (2002)) The effect of CD137 activation on the inhibition of activation induced cell death was shown *in vitro* by Hurtado et al. (J Hurtado et al. J Immunol. 158(6) 2600-9 (1997)) and in an *in vivo* system in which anti-CD137 monoclonal antibodies (mAbs) were shown to produce long term survival of superantigen-activated CD8⁺ T-cells by preventing clonal deletion (C Takahashi et al., J Immunol. 162 5037 (1999)) Later two reports demonstrated, under different experimental conditions, that the CD137 signal regulated both clonal expansion and survival of CD8⁺ T-cells (D Cooper et al., Eur J Immunol. 32(2) 521-9 (2002) M Maus et al., Nat. Biotechnol. 20 143 (2002)) Reduced apoptosis observed after co-stimulation correlated with increased levels of Bcl- χ_L in CD8⁺ T-cells, while Bcl 2 expression remained unchanged. Up-regulation of the anti-apoptotic genes Bcl- χ_L and bfl 1 via 4-1BB was shown to be mediated by NF κ B activation, since PDTC an NF κ B specific blocker inhibited 4-1BB-mediated up-regulation of Bcl- χ_L (H Lee et al., J Immunol. 169(9) 4882-8 (2002)) On the other hand, clonal expansion of activated

T-cells appears to be mediated by increased expression of cyclins D2, D3 and E, and down-regulation of the p27^{kip1} protein. This effect occurs in both an IL-2 dependent and independent fashion (H. Lee et al., J Immunol., 169(9) 4882-8 (2002))

Altogether CD137 stimulation results in enhanced expansion, survival, and effector functions of newly primed CD8+ T-cells, acting, in part, directly on these cells. Both CD4+ and CD8+ T-cells have been shown to respond to CD137 stimulation, however it appears that enhancement of T-cell function is greater in CD8+ cells (W. Shuford et al. J Exp Med., 186(1) 47-55 (1997); I. Gramaglia et al., Eur J Immunol., 30(2) 392-402 (2000); C. Takahashi et al. J Immunol., 162 5037 (1999)). Based on the critical role of CD137 stimulation in CD8+ T-cell function and survival, manipulation of the CD137/CD137L system provides a plausible approach for the treatment of tumors and viral pathogens.

Recently the constitutive expression of CD137 on freshly isolated dendritic cells (DCs) was demonstrated in mice (R. Wilcox et al. J Immunol. 169(8) 4230-6 (2002); T. Futagawa et al., Int. Immunol., 14(3) 275-86 (2002)) and humans (S. Pauly et al. J Leukoc. Biol. 72(1) 35-42 (2002)). These reports showed that stimulation of CD137 on DCs resulted in secretion of IL-6 and IL-12, and, more importantly it enhanced DC ability to stimulate T-cell responses to alloantigens. Furthermore, Pan et al. demonstrated that CD137 signaling in DCs resulted in upregulation of MHC Class I and costimulatory molecules, and produced an increased ability of DCs to infiltrate tumors (P. Pan et al., J Immunol., 172(8) 4779-89 (2004)). Therefore, CD137 costimulation on DCs appears to be a novel pathway for proliferation, maturation, and migration of DCs.

Activated Natural Killer (NK) cells express CD137 following stimulation with cytokines (I. Melero et al., Cell Immunol., 190(2) 167-72 (1998); R. Wilcox et al., J Immunol., 169(8) 4230-6 (2002)). Several reports demonstrated that NK cells appear to be critical for the modulation of the antitumor immune response induced by agonistic CD137 antibodies ((I. Melero et al. Cell Immunol. 190(2) 167-72 (1998); R. Miller et al., J Immunol. 169(4) 1792-800 (2002); R. Wilcox et al., J Immunol. 169(8) 4230-6 (2002)). Depletion of NK cells significantly reduces the antitumor activity of anti-CD137 mAbs. Ligation of CD137 on NK cells induces proliferation and IFN- γ secretion, but does not affect their cytolytic activity. Notably *in vitro*

CD137-stimulated NK cells presented an immunoregulatory or "helper" activity for CD8⁺ cytolytic T-cells resulting in expansion of activated T-cells. Therefore, CD137 signaling on NK cells may modulate innate immunity to tumors.

A paradoxical effect has been described for CD137 stimulation in that
5 agonistic CD137 antibodies can induce suppression of the humoral responses to T-cell antigens in primates and mouse models (H. Hong et al., *J Immunother.*, 23(6) 613-21 (2000) R. Mittler et al., *J Exp Med.*, 190(10) 1535-40 (1999)) Notably CD137 agonistic antibodies were shown to produce significant amelioration of the symptoms associated with antibody dependent autoimmune diseases such as systemic lupus
10 erythematosus and experimental autoimmune encephalomyelitis (J Foell et al., *N Y Acad. Sci.*, 987 230-5 (2003) Y. Sun et al., *Nat. Med.*, 8(12) 1405-13 (2002)) Recently Seo et al demonstrated that, in a mouse model of rheumatoid arthritis, treatment with an agonistic anti-CD137 antibody prevented the development of the disease, and remarkably blocked disease progression (S. K. Seo et al., *Nat. Med.*
15 10 1099-94 (2004)) The mechanism responsible for this effect has not been well defined, but in the model of rheumatoid arthritis it was shown that treatment with a CD137 agonistic antibody resulted in the expansion of IFN- γ producing CD11C-CD8⁺ T cells. IFN- γ in turn stimulated dendritic cells to produce indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), which exerts immuno-suppressive activities. It has also been
20 postulated that CD137 signaling on antigen-activated CD4⁺ T-cells results in induction of IFN- γ secretion which activates macrophages. Activated macrophages can in turn produce death signals for B cells. Continuous signaling through CD137 on CD4⁺ T-cells may subsequently induce activation induced cell death (AICD) of these CD4⁺ activated T-cells. Therefore, by eliminating antigen-activated T-cells and
25 B cells, a reduced antibody response is observed and, consequently a dramatic reduction of Th2-mediated inflammatory diseases is observed (B. Kwon et al. *J Immunol.*, 168(11) 5483-90 (2002)) These studies suggest a role for the use of agonistic CD137 antibodies for the treatment of inflammatory or autoimmune diseases, without inducing a general suppression of the immune system.

30 The natural ligand for CD137, CD137 ligand (CD137L), a 34kDa glycoprotein member of the TNF superfamily, is detected mainly on activated antigen presenting cells (APC) such as B cells, macrophages, dendritic cells, and also on murine B-cell

lymphomas, activated T-cells, and human carcinoma lines of epithelial origin (R. Goodwin et al., Eur J Immunol., 23(10).2631-41 (1993) Z. Zhou et al., Immunol Lett., 45 67 (1995) H. Salih et al., J Immunol., 165(5).2903-10 (2000)) Human CD137L shares 36% homology with its murine counterpart (M. Alderson et al., Eur J Immunol., 24 2219-27 (1994))

In addition to delivering signals to CD137-expressing cells, binding of CD137 to CD137L initiates a bidirectional signal resulting in functional effects on CD137L-expressing cells. Langstein et al. demonstrated that binding of CD137 Ig fusion protein to CD137L on activated monocytes induced the production of IL-6, IL-8, and TNF- α , upregulated ICAM, and inhibited IL-10 resulting in increased adherence (J Langstein et al., J Immunol 160(5).2488-94 (1998)) In addition, proliferation of monocytes was demonstrated along with a higher rate of apoptosis (J Langstein et al., J Leukoc Biol., 65(6) 829-33 (1999)) These observations were confirmed by the studies of Ju et al (S Ju et al., Hybrid Hybridomics, 22(5) 333-8 (2003)) which showed that a functional anti-CD137L antibody induced a high rate of proliferation of peripheral blood monocytes Blocking the ligand resulted in inhibition of T-cell activation. In addition, soluble CD137L was found in the serum of patients with rheumatoid arthritis and hematological malignancies (H. Salih et al., J Immunol., 167(7) 4059-66 (2001)) Thus, the interaction of CD137 with CD137L influences and produces functional effects on T-cells and APC

In another important aspect of T-cell function, it has been demonstrated that agonistic anti-CD137 antibodies rescued T-cell responses to protein antigens in aged mice. It has been well documented that an age-related decline in the immune response to antigens occurs, a process known as immunosenescence (R. Miller Science, 273 70-4 (1996) R. Miller Vaccine, 18 1654-60 (2000) F Hakim et al., Curr Opin Immunol., 16 151-156 (2004)) This phenomenon appears to be due to alterations in the equilibrium between the extent of cellular expansion and cellular survival or death. Bansal Pakala et al tested the hypothesis that secondary costimulation through CD137 can be used to enhance T-cell responses in situations where T-cells do not receive sufficient stimulation, due to either reduced expression of CD3 or CD28 or reduced quality of signals. Their studies showed that aged mice had a deficient *in vitro* recall response compared to young mice (P Bansal-Pakala et

12
11
al., J Immunol., 169(9) 5005-9 (2002)) However when aged mice were treated with anti-CD137 mabs, the proliferative and cytokine responses of T-cells were identical to the responses observed in young mice While the specific mechanism responsible for this effect was not elucidated, it was speculated that enhancing both the expression of anti-apoptotic molecules like Bcl-x_L, and the promotion of IL-2 secretion *in vivo* may play a role in rescuing defective T-cell responses. These studies demonstrated the potential for agonistic anti-CD137 antibodies to rescue weak T-cell responses in elderly immuno-compromised individuals, and has profound implications for the use of anti-CD137 antibodies in cancer patients

10 A role for CD137 targeted therapy in the treatment of cancer was suggested by *in vivo* efficacy studies in mice utilizing agonistic anti murine CD137 monoclonal antibodies. In a paper by Melero et al., agonistic anti-mouse CD137 antibody produced cures in P815 mastocytoma tumors, and in the low immunogenic tumor model Ag104 (L Melero et al., Nat. Med., 3(6) 682-5 (1997)) The anti-tumor effect required both CD4+ and CD8+ T-cells and NK cells, since selective *in vivo* depletion of each subpopulation resulted in the reduction or complete loss of the anti tumor effect. It was also demonstrated that a minimal induction of an immune response was necessary for anti-CD137 therapy to be effective. Several investigators have used anti-CD137 antibodies to demonstrate the viability of this approach for cancer therapy
20 (J Kim et al., Cancer Res 61(5) 2031-7 (2001) O Martinet et al., Gene Ther 9(12) 786-92 (2002) R. Miller et al., J Immunol., 169(4) 1792-800 (2002) R. Wilcox et al., Cancer Res 62(15) 4413-8 (2002))

In support of the anti tumor efficacy data with agonistic CD137 antibodies, signals provided by CD137L have been shown to elicit CTL activity and anti tumor responses (M. DeBenedette et al., J Immunol., 163(9) 4833-41 (1999) B Guinn et al J Immunol 162(8):5003-10 (1999)) Several reports demonstrated that gene transfer of CD137 ligand into murine carcinomas resulted in tumor rejection, demonstrating the requirement of costimulation in generating an efficient immune response (S Mogi et al Immunology 101(4) 541-7 (2000) L Melero et al., Cell Immunol., 190(2) 167-72 (1998) B Guinn et al J Immunol., 162(8) 5003-10 (1999)) Salih et al reported the expression of CD137L in human carcinomas and human carcinoma cell lines (H Salih et al J Immunol 165(5):2903-10 (2000)) and

demonstrated that tumors cells expressing the ligand were able to deliver a co-stimulatory signal to T-cells which resulted in the release of IFN- γ and IL-2, and that this effect correlated with the levels of CD137L on tumors. Whether expression of CD137L in human tumors could make these tumors more susceptible to agonistic CD137 antibodies is not known.

CD137L^{-/-} mice have underscored the importance of the CD137/CD137L system in T-cell responses to both viruses and tumors (M. DeBenedette et al. J Immunol 163(9) 4833-41 (1999) J Tan et al., J Immunol., 164(5) 2320-5 (2000) B Kwon et al., J Immunol., 168(11) 5483-90 (2002)) Studies using CD137 and CD137L-deficient mice have demonstrated the importance of CD137 costimulation in graft vs-host disease, and anti viral cytolytic T-cell responses CD137-deficient mice had an enhanced proliferation of T-cells, but a reduction in cytokine production and cytotoxic T-cell activity (B Kwon et al., J Immunol., 168(11) 5483-90 (2002) D Vinay et al., Immunol Cell Biol., 81(3) 176-84 (2003)) More recently it was shown that knockout mice (CD137^{-/-}) had a higher frequency of tumor metastases (4-fold) compared to control mice These data suggest that restoration of CD137 signaling by the use of agonistic anti-CD137 antibodies is a feasible approach for augmenting cellular immune responses to viral pathogens and cancers

In addition to the data in mouse *in vivo* models which supports the involvement of CD137 signaling in antitumor immune responses, studies conducted in primary human tumor samples have confirmed the role of CD137 in generating effector T-cells In patients with Ewing sarcoma, Zhang et al showed that intratumoral effector T-cells presented the CD3⁺/CD8⁺/CD28⁻/CD137⁺ phenotype. Unexpectedly coexistence of progressive tumor growth and anti-tumor immunity (effector T-cells) was observed. *Ex vivo* stimulation studies with patients cells demonstrated that tumor-induced T-cell proliferation and activation required costimulation with CD137L. Stimulation of PBL with anti-CD3/CD137L, but not anti-CD3/anti-CD28 induced tumor lytic effectors These studies provided further evidence that CD137 mediated costimulation could result in expansion of tumor reactive CTLs (H. Zhang et al Cancer Biol Ther 2(5) 579-86 (2003)) Furthermore, expression of CD137 was demonstrated in tumor infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinomas (HCC) (Y Wan et al., World J

Gastroenterol, 10(2) 195-9 (2004)) CD137 expression was detected in 19 out of 19 HCC by RT PCR, and in 13/19 by immunofluorescence staining. Conversely CD137 was not detected in the peripheral mononuclear cells of the same patients. Analyses conducted in healthy donor liver tissues failed to demonstrate expression of CD137.

- 5 These studies did not attempt to correlate clinical disease with CD137 expression. Thus, studies conducted in Ewing sarcoma and hepatocellular carcinoma revealed the presence of TIL that express CD137 with concomitant disease progression. In Ewing sarcomas it was demonstrated that CD137+TILs were able to kill tumor cells *ex-vivo* suggesting that the CD137 pathway was intact in these patients, and that perhaps
- 10 suppressive factors in the tumor microenvironment inhibited their function. Hence, it can be postulated that systemic administration of agonistic CD137 antibodies may provide the signal necessary for expansion of these effector T-cells.

- In addition to its role in the development of immunity to cancer, experimental data supports the use of CD137 agonistic antibodies for the treatment of autoimmune and viral diseases (B. Kwon et al. Exp. Mol. Med., 35(1) 8-16 (2003); H. Sahli et al. J. Immunol. 167(7) 4059-66 (2001); E. Kwon et al., P.N.A.S. USA, 96 15074-79 (1999); J. Foell et al., N.Y. Acad. Sci., 987 230-5 (2003); Y. Sun et al., Nat. Med., 8(12) 1405-13 (2002); S. K. Seo et al., Nat. Med. 10 1099-94 (2004)).
- 15

- Consequently, based on the roles of 4-1BB in modulating immune response, it would be desirable to produce anti-human 4-1BB antibodies with agonistic activities that could be used for the treatment or prevention of human diseases such as cancer, infectious diseases, and autoimmune diseases.
- 20

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

- 25 The present invention provides fully human antibodies that bind to human 4-1BB (H4-1BB) and that allow binding of H4-1BB to a human 4-1BB ligand (H4-1BBL). Thus, the invention is directed to antibodies that bind to H4-1BB and that do not block the binding of H4-1BB to H4-1BBL, thereby permitting the binding of both an antibody of the invention and H4-1BBL to H4-1BB. The invention also provides
- 30 antibodies with agonistic activities in that binding of the antibodies to H4-1BB results in an enhancement and stimulation of H4-1BB mediated immune responses. These antibodies can be used as immuno-enhancers of an anti-tumor or anti-viral immune

response, or as immunomodulators of T cell mediated autoimmune diseases. The antibodies can also be used as diagnostic tools for the detection of H4-1BB in blood or tissues of patients with cancer autoimmune, or other diseases.

In one aspect, the invention provides a monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds to H4-1BB comprising a light chain variable region and a heavy chain variable region, wherein the light chain variable region comprises a CDR1 (complementary determining region 1), a CDR2 (complementary determining region 2), and a CDR3 (complementary determining region 3) as depicted in FIG 4 and the heavy chain variable region comprises a CDR1 (complementary determining region 1), a CDR2 (complementary determining region 2), and a CDR3 (complementary determining region 3) as depicted in FIG 3 or FIG 7. The monoclonal antibody (mab) can be, for example, an IgG4 antibody or IgG1 antibody.

In another aspect, the invention provides a monoclonal antibody or antigen binding portion thereof, wherein the light chain comprises a variable region as depicted in FIG 4 and the heavy chain comprises a variable region as depicted in FIG 3 or FIG 7.

In another aspect, the invention provides a monoclonal antibody comprising a light chain and a heavy chain, wherein the light chain comprises amino acid residues 21-236 of SEQ ID NO 6 and the heavy chain comprises amino acid residues 20-467 of SEQ ID NO 3. In another aspect, the invention provides a monoclonal antibody comprising a light chain and a heavy chain, wherein the light chain comprises amino acid residues 21-236 of SEQ ID NO 6 and the heavy chain comprises amino acid residues 20-470 of SEQ ID NO 9.

The antibodies of the invention have wide therapeutic applications as immunomodulators of diseases such as cancer autoimmune diseases, inflammatory diseases, and infectious diseases.

The invention further provides methods for treating cancer in a subject comprising administering a therapeutically effective amount of an antibody of the invention to the subject. In one aspect, this method further comprises administering a vaccine. Suitable vaccines include, for example, a tumor cell vaccine, a DNA vaccine, a GM-CSF modified tumor cell vaccine, or an antigen-loaded dendritic cell

vaccine. The cancer can be, for example, prostate cancer melanoma, or epithelial cancer

In another aspect, the invention provides a method for enhancing the immune response, comprising administration of an antibody of the invention and a SIV gag vaccine In another aspect, the invention provides a method for enhancing the immune response, comprising administration of an antibody of the invention and a PSA vaccine In another aspect, the invention provides a method for enhancing the immune response to a SIV gag vaccine, comprising administration of an antibody of the invention. In another aspect, the invention provides a method for enhancing the immune response to a PSA vaccine, comprising administration of an antibody of the invention.

The invention also provides pharmaceutical compositions comprising an antibody of the invention, or an antigen binding portion thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier The pharmaceutical composition can be administered alone or in combination with an agent, e.g., an agent for treating cancer such as a chemotherapeutic agent or a vaccine or other immunomodulatory agent.

The invention also provides isolated polynucleotides comprising a nucleotide sequence selected from (a) nucleotides that encode the amino acid sequence of amino acid residues 20-467 of SEQ ID NO 3 (b) nucleotides that encode the amino acid sequence of SEQ ID NO 3 (c) nucleotides that encode the amino acid sequence of amino acid residues 21-236 of SEQ ID NO 6 (d) nucleotides that encode the amino acid sequence of SEQ ID NO 6 (e) nucleotides that encode the amino acid sequence of amino acid residues 20-470 of SEQ ID NO 9 (f) nucleotides that encode the amino acid sequence of SEQ ID NO 9 and (g) nucleotides that encode a fragment of an amino acid sequence of (a) to (f), such as a variable region, constant region, or one or more CDRs. The isolated polynucleotides of the invention further comprise nucleotide sequences encoding at least one CDR of FIG 3 at least one CDR of FIG 4 or at least one CDR of FIG 7 The invention further provides isolated polynucleotides that comprise the nucleotide sequence of SEQ ID NO 1 SEQ ID NO 4 or SEQ ID NO 7

The invention also provides isolated polypeptides comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 3 SEQ ID NO 6 and

SEQ ID NO 9 In another aspect, the invention provides isolated polypeptides comprising the amino acid sequence of amino acid residues 20-467 of SEQ ID NO 3 isolated polypeptides comprising the amino acid sequence of amino acid residues 21 236 of SEQ ID NO 6, and isolated polypeptides comprising the amino acid sequence of amino acid residues 20-470 of SEQ ID NO 9 In another aspect, the invention provides isolated polypeptides comprising the amino acid sequence of at least one CDR of FIG 3 FIG 4 or FIG 7 or at least the variable or constant region of FIG 3 FIG 4 or FIG 7

The invention further includes an immunoglobulin having binding specificity for H4-1BB said immunoglobulin comprising an antigen binding region. In one aspect, the immunoglobulin is a Fab or F(ab)₂ of an antibody of the invention.

The invention also includes a cell line that produces an antibody or antigen binding portion thereof of the invention, recombinant expression vectors that include the nucleotides of the invention, and methods to make the antibodies of the invention by culturing an antibody producing cell line.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG 1 shows a plasmid map of pD17 20H4 9.h4a.

FIG 2 shows a plasmid map of pD16gate-20H4 9.LC

FIG 3 (FIGS 3A-3H) shows the nucleotide sequence of the plasmid pD17 20H4 9.h4a, including the coding strand (SEQ ID NO 1), complementary strand (SEQ ID NO 2), and amino acid sequence (leader peptide is amino acid residues 1-19 of SEQ ID NO 3 heavy chain is amino acid residues 20-467 of SEQ ID NO 3) encoded by the coding strand

FIG 4 (FIGS 4A-4F) shows the nucleotide sequence of the plasmid pD16gate-20H4 9.LC, including the coding strand (SEQ ID NO 4), complementary strand (SEQ ID NO 5), and amino acid sequence (leader peptide is amino acid residues 1-20 of SEQ ID NO 6 light chain is amino acid residues 21-236 of SEQ ID NO 6) encoded by the coding strand.

FIG 5 shows a schematic of the 20H4 9-IgG1 heavy chain sequence construct.

FIG 6 shows a schematic of the 20H4 9 light chain sequence construct.

FIG 7 (FIGS 7A-7D) shows the nucleotide and amino acid sequences of the 20H4 9-IgG1 heavy chain construct, including the coding strand (SEQ ID NO 7), complementary strand (SEQ ID NO 8), and amino acid sequence (leader peptide is amino acid residues 1-19 of SEQ ID NO 9; heavy chain is amino acid residues 20-470 of SEQ ID NO-9) encoded by the coding strand.

FIG 8 (FIGS 8A-8B) illustrates the results obtained from the binding of mab 20H4 9-IgG1 to human CD137 by ELISA (FIG 8A) and the effect of mab 20H4 9 IgG1 on CD137-CD137L interaction (FIG 8B).

FIG 9 (FIGS 9A-9B) illustrates the results obtained from the binding of mab 20H4 9-IgG1 to PMA ionomycin stimulated human or cynomolgus monkey cells. Human CEM (FIG 9A) or monkey PBMC (FIG 9B) were incubated with 20H4 9-IgG1 or human CD137L fusion protein.

FIG 10 (FIGS 10A-10B) illustrates the results obtained by induction of IFN- γ in co-stimulatory studies with anti-CD137 antibodies, which are expressed as fold increase in pg/ml over controls. Due to the variable background response among donors, data was normalized relative to control treatments (=1). Median IFN- γ baseline level for human T-cells (FIG 10A) or monkey PBMC (FIG 10B) stimulated with anti-CD3 alone was 592 pg/ml and 505 pg/ml respectively.

FIG 11 provides plasmon resonance plots of binding of mab 20H4 9 IgG4 and mab 20H4 9 IgG1 to human CD137.

FIG 12 illustrates the concentration-dependent binding of 20H4 9 IgG4 to PMA ionomycin stimulated human CEM cells, but no binding to unstimulated CEM cells.

FIG 13 (FIGS 13A-13B) illustrates the induction of IFN- γ in co-stimulatory studies with anti-CD137 antibodies. The results are expressed as fold increase in pg/ml over controls. Due to the variable background response among donors, data was normalized relative to control treatments (=1). Median IFN- γ baseline level for human T-cells (FIG 13A) or monkey PBMC (FIG 13B) stimulated with anti-CD3 alone was 592 pg/ml and 505 pg/ml respectively.

FIG 14 (FIGS 14A-14B) illustrates the results obtained of dose-dependent enhancement of IFN- γ synthesis by mab 20H4 9 IgG4 (FIG 14A) and effect of

antibody crosslinking by addition of crosslinking anti human IgG antibody (7 µg/ml) (FIG 14B)

FIG 15 illustrates the effect of mab 20H4 9-IgG4 on T-cell survival and cell cycle progression. Human T-cells were costimulated with anti-CD3 (1 ug/ml) ± mab 20H4 9 IgG4 at the concentrations listed. Six days after initiation of the assays, cells were collected and stained with Annexin V and propidium iodide to determine the number of live cells (Annexin V/PI negative) or PE-conjugated cyclin D2 to detect cycling cells. Results represent the mean (±SD) of 4 lots of mab 20H4 9 IgG4 tested in parallel

FIG 16 (FIGS 16A 16D) shows in cynomolgus monkeys the antigen-specific IFN-γ response as measured by ELISPOT after treatment with a DNA vaccine ± anti human 4-1BB antibodies. Animals were treated with a SIV gag vaccine (day 0 28 56 FIG 16A), SIV gag vaccine (day 0 28, 56) and mab 20H4.9-IgG4 (day 12, 15 and 19 FIG 16B), or SIV gag vaccine (day 0 28 56) and hu39E3 G4 (day 12 15 and 19 FIG 16C). A group of animals was left untreated (FIG 16D). At various times following treatment, blood was collected, and PBMC were separated and evaluated for their ability to secrete IFN-γ in the presence of antigen stimulation.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention is directed to the preparation and characterization of antibodies, and antigen binding fragments thereof (including fusion proteins that comprise an antigen binding fragment of an antibody of the invention) for use in the treatment of a disease, such as a cancer, infectious disease, inflammatory disease, or autoimmune disease. The cancer can be, for example, prostate cancer, melanoma, or epithelial cancer.

The antibodies are capable of binding to H4-1BB and can present high affinity for H4-1BB and effectively enhance T cell responses. In one aspect, the antibody induces IFN-γ production in co-stimulatory assays but does not affect the binding of H4-1BB to its corresponding ligand, H4-1BBL, and does not fix complement.

The antibodies of the invention may be produced by methods well known in the art. In one aspect, the antibodies can be produced by expression in transfected cells, such as immortalized eukaryotic cells, such as myeloma or hybridoma cells

The antibodies of the invention may be used alone, or together with other
 5 therapeutic agents such as radiotherapy (including radiation), hormonal therapy
 cytotoxic agents, vaccines, and other immunomodulatory agents, such as cytokines
 and biological response modifiers. These agents are particularly useful in treating
 cancer and immune-proliferative disorders

In one aspect, the invention provides the monoclonal antibody (mab) 20H4 9-
 10 IgG4 FIGS 1 and 2 provide plasmid maps of pD17 20H4 9.h4a and pD16gate-
 20H4 9.LC, respectively that can be used to produce mab 20H4.9-IgG4 FIG 3
 (FIGS 3A-3H) provides the nucleotide sequence of the plasmid pD17 20H4.9 h4a,
 including the coding strand (SEQ ID NO 1) complementary strand (SEQ ID NO 2),
 and amino acid sequence (leader peptide is amino acid residues 1-19 of SEQ ID
 15 NO 3 heavy chain is amino acid residues 20-467 of SEQ ID NO 3) encoded by the
 coding strand. FIG 4 (FIGS 4A-4F) shows the nucleotide sequence of the plasmid
 pD16gate-20H4.9.LC including the coding strand (SEQ ID NO 4), complementary
 strand (SEQ ID NO 5), and amino acid sequence (leader peptide is amino acid
 residues 1-20 of SEQ ID NO 6 light chain is amino acid residues 21-236 of SEQ ID
 20 NO 6) encoded by the coding strand.

In another aspect, the invention provides the monoclonal antibody (mab)
 20H4 9 IgG1 FIG 5 schematically shows a heavy chain sequence construct of mab
 20H4 9-IgG1 FIG 6 schematically shows a light chain sequence construct of mab
 20H4 9 for both mab 20H4 9 IgG4 and 20 H4 9 IgG1 FIG 7 provides the
 25 nucleotide sequence (coding strand (SEQ ID NO 7) and complementary strand (SEQ
 ID NO 8)) of the heavy chain sequence construct of FIG 5 and the amino acid
 sequence (leader peptide is amino acid residues 1-19 of SEQ ID NO 9 heavy chain is
 amino acid residues 20-470 of SEQ ID NO 9) encoded by the coding strand The
 light chain of mab 20H4 9 IgG1 is the same as the light chain of mab 20H4 9-IgG4

30 The invention also encompasses antibodies with conservative amino acid
 substitutions from the heavy and light chain amino acid sequences depicted in SEQ
 ID NOS 3, 6 and 9 that have substantially no effect on H4-1BB binding

Conservative substitutions typically include the substitution of one amino acid for another with similar characteristics, e.g., substitutions within the following groups: valine, glycine, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine, serine, threonine, lysine, arginine and phenylalanine, tyrosine.

The polynucleotides encoding the polypeptides of the invention typically further comprise an expression control sequence operably linked to the polypeptide coding sequences, including naturally-associated or heterologous promoter regions. Preferably the expression control sequences will be eukaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or transfecting eukaryotic host cells, but control sequences for prokaryotic hosts may also be used. Once the vector has been incorporated into an appropriate host, the host is maintained under conditions suitable for high level expression of the nucleotide sequences and, as desired, the collection and purification of the light chain, heavy chain, light/heavy chain dimers or intact antibody binding fragments or other immunoglobulin form may follow (See, S Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N Y (1979)). Single chain antibodies or minibodies (single chain antibodies fused to one or more CH domains) may also be produced by joining nucleic acid sequences encoding the VL and VH regions disclosed herein with DNA encoding a polypeptide linker.

Prokaryotic hosts, such as E. coli, and other microbes, such as yeast, may be used to express an antibody of the invention. In addition to microorganisms, mammalian tissue cell culture may also be used to express and produce the antibodies of the invention. Eukaryotic cells may be preferred, because a number of suitable host cell lines capable of secreting intact immunoglobulins have been developed including, for example, CHO (chinese hamster ovary) cell lines, COS (African green monkey fibroblast cell line) cell lines, HeLa cells, myeloma cell lines, and hybridomas. Expression vectors for these cells can include expression control sequences, such as a promoter or enhancer and necessary processing information sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional terminator sequences, all well known in the art.

The vectors containing the DNA segments of interest (e.g., the heavy and/or light chain encoding sequences and expression control sequences) can be transferred

into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly used for prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment, lipofection, or electroporation may be used for other cellular hosts. (See, e.g. T. Maniatis et al.,
5 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1982))

Once expressed, the antibodies, their dimers, individual light and heavy chains, or other immunoglobulin forms, can be purified according to standard procedures in the art, such as ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis, and the like. Substantially pure
10 immunoglobulins of at least 90 to 95% homogeneity are desirable, and 98 to 99% or more homogeneity are more desirable

The antibodies of the invention are useful for modulating T cell and antibody-mediated immune responses. Typical disease states suitable for treatment include cancers, infectious diseases, inflammatory diseases, and autoimmune diseases such as
15 multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and myasthenia gravis

The invention also provides pharmaceutical compositions comprising at least one antibody of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. The pharmaceutical compositions may be sterilized by conventional well known
20 sterilization techniques. The pharmaceutical compositions can also contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions such as pH adjusting and buffering agents, stability enhancing agents such as mannitol or tween 80, toxicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride,
25 sodium lactate, or human albumin.

The antibodies and pharmaceutical compositions of the invention are particularly useful for parenteral administration, including subcutaneous intramuscular and intravenous administration. The pharmaceutical compositions for parenteral administration can comprise a solution of the antibody dissolved in an
30 acceptable carrier, preferably an aqueous carrier. A variety of aqueous carriers can be used, all well known in the art, e.g., water, buffered water, saline, glycine and the like. These solutions are sterile and generally free of particulate matter. It is especially

advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage.

The pharmaceutical composition can further comprise an additional agent for treatment of a disease. In one aspect, the pharmaceutical composition includes an agent for treatment of a cancer, an infectious disease, inflammatory disease, or autoimmune disease. The antibody of the invention can also be co-administered or separately administered with an additional agent for treatment of a disease.

The antibodies of the invention can be used with other agents to enhance the immune response to cancerous cells in a patient. In one aspect, the antibody is used in combination with an immunogenic agent, such as cancerous cells, purified tumor antigens (including recombinant proteins, peptides, and carbohydrate molecules), or cells transfected with genes encoding immune stimulating cytokines and cell surface antigens. In another aspect, the antibody is used in combination with a vaccine such as, for example, a tumor cell vaccine, a DNA vaccine, a gene-modified tumor cell vaccine, such as GM-CSF-modified tumor cell vaccine, a peptide vaccine, or an antigen loaded dendritic cell vaccine.

Many experimental strategies for vaccination against tumors have been devised. In one of these strategies, a vaccine is prepared using autologous or allogeneic tumor cells. These cellular vaccines have been shown to be most effective when the tumor cells are transduced to express GM-CSF. GM-CSF has been shown to be a potent activator of antigen presentation for tumor vaccination (Dranoff et al., P.N.A.S. 90 3539-43 (1993); E. Jaffe et al., J. Clin. Oncol. 19 145-56 (2001); R. Salgia et al., J. Clin. Oncol., 21 624-30 (2003)).

The study of gene expression and large scale gene expression patterns in various tumors has led to the definition of so called tumor specific antigens (S. Rosenberg, Immunity 10 281-7 (1999)). In many cases, these tumor specific antigens are differentiation antigens expressed in the tumors and in the cell from which the tumor arose, for example melanocyte antigens gp 100, MAGE antigens, Trp-2. Many of these antigens can be shown to be the targets of tumor specific T cells found in the host. The antibodies of the invention may be used in conjunction with a collection of recombinant proteins and/or peptides expressed in a tumor in order to amplify and direct the immune response to these antigens towards a Th1 response. These proteins

are normally viewed by the immune system as self antigens and are therefore tolerant to them

In one aspect of the invention, the antibody is combined with an immunomodulatory agent comprising the SIV gag antigen (as a model for HIV DNA vaccine) or prostate specific antigen (PSA) or a DNA vaccine comprising a nucleotide sequence that encodes the SIV gag antigen or prostate specific antigen (PSA). PSA vaccines are described in, for example, M Pavlenko et al Br J Cancer 91(4) 688-94 (2004) J Wolchok et al Semm. Oncol., 30(5) 659-66 (2003) J Kim et al. Clin. Cancer Res 7(3 Suppl) 882s-889s (2001). SIV gag vaccines are described in, for example, B Makitalo et al., J Gen. Virol. 85(Pt 8) 2407-19 (2004) N Letvin et al J Virol 78(14) 7490-7 (2004) S Mossman et al., AIDS Res Hum. Retroviruses., 20(4) 425-34 (2004) F Bertley et al., J Immunol., 172(6) 3745-57 (2004) L Patterson et al., J Virol., 78(5) 2212-21 (2004) E O'Neill et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 19(10) 883-90 (2003) Z. Bu et al. Virology 309(2) 272-81 (2003)

The tumor antigen may also include, for example, the protein telomerase, which is required for the synthesis of telomeres of chromosomes and which is expressed in more than 85% of human cancers and in only a limited number of somatic tissues (N Kim et al Science, 266 2011-2013 (1994)). Tumor antigen may also be neo-antigens expressed in cancer cells because of somatic mutations that alter protein sequence or create fusion proteins between two unrelated sequences, or idiotype from B cell tumors. Other tumor vaccines may include the proteins from viruses implicated in human cancers such as Human Papilloma Viruses (HPV) Hepatitis Viruses (HBV and HCV) and Kaposi's Herpes Sarcoma Virus (KHSV). Another form of tumor specific antigen which may be used with an antibody of the invention is purified heat shock proteins (HSP) isolated from the tumor tissue itself. These heat shock proteins contain fragments of proteins from the tumor cells and these HSPs are highly efficient at delivery to antigen presenting cells for eliciting tumor immunity (R. Suot et al., Science 269 1585-1588 (1995) Y. Tamura et al., Science 278 117-120 (1997)).

The antibodies of the invention can also be used to enhance the immune response to vaccines to viral antigens, such as HIV or HCV. The antibodies of the

invention can also be used to enhance the immune response to other immunomodulatory agents, and to elicit a memory immune response. Examples of these agents are cytokines such as GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-12, Fl3 ligand, CD40 ligand, adjuvants such as CpG-oligodeoxynucleotide (bacterial DNA) or antibodies to OX-40 or CTLA-4

The pharmaceutical compositions of the invention can be administered for prophylactic and/or therapeutic treatments. In therapeutic application, the pharmaceutical composition is administered to a patient already suffering from a disease, in an amount sufficient to cure or at least partially arrest or treat the disease. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective dose." Amounts effective for this use will depend upon the severity of the disease state and the patient (including, for example, the general state of the patient's own immune system), and can be determined by one skilled in the art. In prophylactic applications, the pharmaceutical composition is administered to a patient not already in the disease state, to enhance the patient's resistance to the disease state. Such an amount is defined to be a "prophylactically effective dose." In this use, the precise amounts depend upon the patient's state of health (including, for example, the general state of the patient's own immune system), and can be determined by one skilled in the art. In one aspect, the prophylactic use is for the prevention of tumor recurrence.

20

Examples

Example 1 Generation of Antibodies

Materials and Methods

Fully human monoclonal antibodies to the human CD137 (4-1BB) receptor were generated in the HuMAb-Mouse® (Medarex, Inc., Princeton, New Jersey). HuMAb mice were immunized five times intraperitoneally (i.p.) and subcutaneously (s.c.) with 25 µg of the extracellular domain of human CD137 in RIBI adjuvant (Ribi Immunochemical). Prior to fusion, mice were boosted intravenously (i.v.) with the same amount of antigen. Spleen cells from immunized mice with adequate titers of antibodies to huCD137 were fused to mouse myeloma cells following standard procedures.

18 74

Anti human CD3 mab (clone.HIT3a), ELISA kits for human and monkey IFN- γ cytometric bead array (CBA) kits, and all conjugated antibodies for flow cytometry were purchased from BD Pharmingen (San Diego, California) Human IgG $_1$ λ and Human IgG $_1$ κ were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri)

5 CEM cells (ATCC-CRL 2265) were purchased from ATCC Culture media (RPMI) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Mediatech Inc (Herndon, Virginia) Sheep Red Blood Alsevers was purchased from Colorado Serum Co (Denver Colorado)

Hybridoma screening: Detection of binding to huCD137 by ELISA. To

10 identify hybridomas secreting anti human CD137 antibodies, ELISA plates (Nunc MaxiSorp) were coated with human CD137-mouse IgG $_{2b}$ fusion protein at 1 μ g/ml in PBS overnight at 4 C Plates were then washed 3 times with PBS with 0.01% Tween 80 (PBS-T), and subsequently blocked with PBS-T plus 1% bovine serum albumin (BSA), for 20 min at room temperature Fifty microliters of supernatants diluted 1:3

15 in PBS-T were added to the plates and incubated for 1-2 hr at ambient temperature Afterwards, plates were washed as before, and binding of antibodies was detected by an incubation with alkaline phosphatase-conjugated goat F(ab) $_2$ anti human IgG antibody (Jackson Laboratories, West Grove, Pennsylvania) Plates were developed with pNPP and read at 405 nm

20 Blocking assay: Twenty six hybridomas secreting antibodies that recognized huCD137 by ELISA were evaluated for their ability to allow CD137-CD137L interactions These analyses were conducted initially in an ELISA format Plates were coated with human CD137 mIgG $_{2b}$ at 0.2 μ g/ml, 100 μ l/well Serial dilutions of the mab 20H4.9 IgG1 or control antibodies, diluted in PBS-T and 1% bovine

25 serum albumin, were added to the plate CD137L-CD8 fusion protein was added to the wells at a concentration of 0.2 μ g/ml Binding of antibodies was detected with a biotinylated anti-CD8 antibody (0.2 μ g/ml, Ancell Corporation, Bayport, Minnesota) After several washes, streptavidin-alkaline phosphatase (1:2000) and pNPP for the detection of bound antibodies were added, and the plates were read at 405 nm

30 To confirm that the selected antibodies did not alter CD137-CD137L binding, purified antibodies were further characterized by BIAcore analyses All experiments were carried out on a BIAcore 3000 instrument (BIAcore Inc., Piscataway New

Jersey) Human CD137 was immobilized covalently at a high density on a carboxy methylated dextran surface of a BIAcore sensorchip (BIAcore Inc. Piscataway New Jersey) Injections were conducted at 2 µg/mL in 10 mM acetate buffer pH 5.0. Unoccupied active esters were subsequently blocked by injection of an excess of ethanolamine. Regeneration of the surface was done with 10 mM glycine, pH 2.0.

Purified samples of anti-CD137 antibodies were diluted to concentrations between 200 and 1000 nM using HEPES buffered saline, pH 7.4 supplemented with 0.15 M NaCl and 0.005% surfactant P20 (HBS-EP). Human CD137L-CD8 fusion proteins (huCD137L) were used as source of CD137 ligand. Experiments were conducted in which huCD137L was injected prior to anti-CD137 antibodies, or vice versa. Injections were performed at a flow rate of 5 µL/min. Bound ligand and antibodies were removed by regeneration with 10 mM glycine buffer pH 2.0.

Human T-cell purification. T-cells or PBMCs were obtained from healthy human donors. Blood was collected in EDTA, suspended in elutriation buffer (RPMI containing 2.5 mM EDTA, 10 µg/ml polymyxin B), underlaid with Lymphocyte Separation Medium (LSM, Mediatech Inc., Herndon, Virginia), and centrifuged at 1800 rpm for 25 minutes. Cellular interfaces were collected, and centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes. Afterwards, cell pellets were resuspended in elutriation buffer and washed. Sheep Red Blood Cells (SRBC, 1:10 dilution), and incubated on ice for 1 hour. Cells were then underlaid with LSM and centrifuged at 2500 rpm for 25 minutes. Interfaces were removed and SRBC were lysed with SRBC Lysis Buffer. Isolated T-cells were washed and resuspended in 10% FBS/RPMI.

Flow Cytometric analyses. Binding of anti-human CD137 antibodies to CD137 expressed on cells was determined by flow cytometry. A human T-cell leukemia cell line (CEM) or cynomolgus monkey peripheral blood monocyctic cells (PBMC) were used for these studies. These cells do not express CD137 constitutively but the receptor can be induced by stimulation with phorbol myristate (PMA, 10 ng/ml) and ionomycin (1 µM) for 18 hr. Cells were then washed and incubated with various concentrations of the antibodies in staining buffer (phosphate buffer saline, PBS, plus 1% FCS and 0.01% sodium azide). Binding of the antibodies to stimulated or non-stimulated cells was detected by a fluorescein (FITC) or phycoerythrin (PE) conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch,

West Grove, Pennsylvania) To confirm expression of CD137 a fusion protein consisting of the extracellular domain of CD137 ligand and mouse CD8 was used (Ancell Corporation, Bayport, Minnesota), followed by incubation with PE-conjugated anti-mouse CD8 (BD Pharmingen, San Diego, California) Samples were
5 fixed in 1% formalin kept at 4 °C, and read by flow cytometry

Functional assays Primary human T-cells or monkey PBMC obtained from healthy donors were stimulated with immobilized anti-CD3 antibody to provide the first signal for T-cell activation, and co-stimulated with human anti human CD137 antibodies. As a non-specific control, a humanized anti-carcinoma antibody (BR96)
10 was used at the same antibody concentration. Plates were coated with anti-CD3 antibody (0.5-1 µg/ml) at 4 °C overnight. The next day T-cells or PBMC were plated at $1-1.5 \times 10^5$ /well concentrations. Synthesis of IFN- γ was measured after 72 hours of culture at 37 °C either by cytometric bead array (CBA) or by ELISA.

Cytokine assays

15 ELISA. After stimulation of T-cells at various times, plates were centrifuged and media was removed. Cytokine levels were detected by an ELISA in accordance with the manufacturer's instructions (BD Pharmingen, San Diego, California) In brief, test samples and standards were added to anti-cytokine-coated 96-well plates After incubation for 2 hr at ambient temperature, plates were washed 3 times in PBS
20 T and then incubated first with a working detector antibody followed by the addition of substrate. Absorbance was read at 405 nm and concentrations were calculated based on the standard curve

Cytometric Bead Array Another method used to determine cytokine production *in vitro* was flow cytometry using the Cytometric Bead array (CBA)
25 developed by BD Pharmingen Levels of IFN- γ IL-2, IL-5 IL-4 IL-10 and TNF- α were measured in culture supernatants following manufacturer's instructions Results were analyzed by flow cytometry with the CBA analysis software

Results

30 Hybridomas secreting antibodies that showed binding to human CD137 were further expanded, and subcloned. Secreted antibodies were purified and tested for their ability to bind to huCD137 and to allow the interaction of CD137-CD137L. Of the panel of anti-human CD137 antibodies evaluated, mab 20H4.9 IgG1 was selected

for further evaluation based on its binding profile and non-blocking properties. The 20H4 9-IgG1 antibody is IgG1 kappa as determined by ELISA using alkaline phosphatase anti-human IgG1 2, 3 4 and anti-kappa and lambda reagents (Southern Biotech, Birmingham, Alabama). FIG 8 (FIG 8A binding to human CD137 by ELISA, FIG 8B effect of mab 20H4 9-IgG1 on CD137-CD137L interaction) provides the initial characterization of mab 20H4.9-IgG1. Serial dilutions of mab 20H4 9-IgG1 26G6 (a blocking anti-CD137 antibody) or tetanus toxoid (TT negative control) were evaluated for their ability to alter binding of CD137 to CD137L. Mab 20H4 9 IgG1 at concentrations up to 10 µg/ml did not block CD137L binding, whereas mab 26G6 inhibited binding at concentrations > 0.37 µg/ml.

Mab 20H4 9-IgG1 was also tested for reactivity towards CD137 expressed on human T-cells (CEM) and in cynomolgus monkey peripheral blood monocyte cells (PBMC) stimulated with PMA and ionomycin. Previous studies determined that CD137 is upregulated on T-cells following activation with PMA and ionomycin. Control molecules consisted of an irrelevant human IgG antibody (negative control) or CD137L-CD8 fusion protein (positive control BD Pharmingen, San Diego, California). Results from these studies indicated that mab 20H4 9-IgG1 bound to activated human CEM and PBMCs from cynomolgus monkeys, with minimum binding to unstimulated cells. Similar percentages of positive cells were detected with either mab 20H4.9-IgG1 or CD137L. FIG 9 provides the results obtained demonstrating the binding of mab 20H4 9 IgG1 to PMA ionomycin stimulated human or cynomolgus monkey cells. Human CEM (FIG 9A) or monkey PBMC (FIG 9B) were incubated with 20H4 9 IgG1 or human CD137L fusion protein. Secondary antibodies were added and samples were read by flow cytometry.

Next, it was determined whether mab 20H4 9 IgG1 could induce enhancement of IFN-γ in costimulatory assays in the presence of anti-CD3 stimulation, the key functional effect desired for an agonistic CD137 antibody. Mab 20H4 9 IgG1 was evaluated for its co-stimulatory activity in functional studies in human and monkey lymphocytes. Based on initial data, a concentration of 20 µg/ml anti-CD137 antibody (excess antibody) was used in these studies. Levels of anti-CD3 antibody between 0.2-1 µg/ml were tested which resulted in 10-20% CD137 positive lymphocytes. Levels of IFN-γ in supernatants were measured after 72 h of culture. As shown in

FIG 10 mab 20H4.9 IgG1 enhanced IFN- γ synthesis in both human and monkey costimulatory assays to levels significantly higher than controls. Results of studies conducted with T-cells isolated from 8 healthy human donors showed that in six of them, mab 20H4.9 IgG1 enhanced IFN- γ synthesis between 2.2-4.3 fold compared to controls. One of the other two donors showed a 1.6-fold increase. The level of enhancement was superior to that observed with hu39E3 G4, a humanized anti-CD137 antibody provided in published PCT Application WO04/010947 (herein incorporated by reference) which showed augmentation of IFN- γ in 5 out of 8 donors and at levels lower than mab 20H4.9-IgG1 (1.5-2-fold increase) (FIG 10A). In monkey costimulatory studies, mab 20H4.9 IgG1 also demonstrated enhanced functional activity resulting in significant augmentation of IFN- γ over controls (FIG 10B). As in the human studies, enhancement of IFN- γ was consistently higher than with hu39E3 G4.

Induction of TNF- α synthesis above control levels was also observed in human cultures, albeit at much lower levels than IFN- γ . TNF- α levels induced by anti-CD3 antibody alone (baseline) were about 20-50 fold lower than baseline levels for IFN- γ . Mab 20H4.9 IgG1 induced an increase of ~2 to 4.7 fold in 3 out of 8 donors. Again, hu39E3 G4 (tested in parallel) induced ~2-fold increase in the same donors but at lower levels. Other cytokines tested, IL-2, IL-5, IL-10 and IL-4 did not change significantly with either treatment.

Together these studies demonstrated that mab 20H4.9 IgG1 presented the functional activity desired in both humans and monkeys by inducing a Th1 type of response. Significantly, since *in vivo* anti-tumor activity is associated with the ability of anti-CD137 antibodies to induce IFN- γ synthesis, these results supported the selection of mab 20H4.9-IgG1 for isotype switching.

Example 2 *In vitro* characterization of mab 20H4.9 IgG4

Based on its binding kinetics, inability to block CD137-CD137L interaction and functional effects on human T-cells, mab 20H4.9 IgG1 was selected for switching to an IgG4 form. The IgG4 form of mab 20H4.9-IgG1 is 20H4.9 IgG4 (depicted in FIGS 3 and 4).

The second phase of these studies involved the comparison of the *in vitro* properties of mab 20H4.9-IgG4 and mab 20H4.9-IgG1. In this section the binding

kinetic properties, and functional effects of both antibodies in human and monkey lymphocytes are described.

Binding kinetics

Kinetic properties of anti-human CD137 antibodies were evaluated by surface plasmon resonance using a BIAcore 3000 instrument. The antigen, human CD137 murine IgG_{2b}, was immobilized covalently at a low density on the surface of a CM5 sensorchip. Mab 20H4 9 IgG4 and mab 20H4 9-IgG1 were injected at concentrations between 25 and 200 nM. FIG 11 depicts injections at 100 nM for both mab 20H4 9-IgG1 and mab 20H4 9 IgG4. Data calculated using BIAevaluation software (bivalent model, global curve fit analysis) resulted in kinetic parameters that were similar for both antibodies (see Table 1). Dissociation constants K_D for mab 20H4 9 IgG1 and mab 20H4 9-IgG4 were determined as 11.2 and 16.6 nM, respectively. Under similar experimental conditions, mab 20H4 9 IgG4 did not bind to murine 4-1BB.

Table 1 Comparison of the binding kinetics of mab 20H4 9 IgG4 and mab 20H4 9-IgG1

antibody	k _{a1} (1/Ms)	k _{d1} (1/s)	k _{a2} (1/RUs)	k _{d2} (1/s)	R _{max} (RU)	K _{A1}	K _{D1} (nM)
20H4 9-IgG1	3.43E+04	3.85E-04	2.30E-05	1.51E-03	262	8.91E+07	11.22
20H4 9-IgG4	3.92E+04	6.51E-04	0.0755	0.105	409	6.02E+07	16.61

Flow cytometric analyses

Biotinylated mab 20H4 9 IgG4 at concentrations ranging from 0.32 ng/ml to 5 µg/ml was tested for binding to CEM cells ± PMA ionomycin. Mab 20H4.9 IgG4 bound to PMA ionomycin stimulated CEM cells in a concentration-dependent manner. Saturation was achieved at 0.2 µg/ml. On the other hand, as shown for its parental molecule, mab 20H4 9 IgG1, mab 20H4 9-IgG4 did not bind to CEM cells that were not stimulated with PMA ionomycin (FIG 12). Concentration-dependent binding of mab 20H4- 9-IgG4 was demonstrated in PMA-ionomycin stimulated CEM cells (FIG 12). Samples were read by flow cytometry.

Cellular/Functional Assays

To confirm that the process of switching the isotype of mab 20H4 9-IgG1 did not alter the activity of the antibody *in vitro* studies were conducted to compare the activity of mab 20H4 9-IgG4 to the parent mab 20H4.9-IgG1 in monkey PBMC and human T-cells. The functional effects of mab 20H4 9 IgG4 on human and monkey T cells or PBMC were determined and compared to its parental molecule, mab 20H4 9-IgG1. Primary human T-cells or monkey PBMC obtained from healthy donors were stimulated with anti-CD3 antibody (0.5 µg/ml 1 µg/ml) +/- anti human CD137 antibodies. Synthesis of IFN-γ was measured after 72 h of culture at 37 °C by cytometric bead array (CBA) for human samples or by ELISA for monkey samples. Antibodies were tested in costimulatory assays in the presence of suboptimal concentrations of anti-CD3 antibody (1 µg/ml) or Concanavalin A (1 µg/ml) (donors M5170 and 81 only). Results are expressed as fold increase in pg/ml over controls. Due to the variable background response among donors, data was normalized relative to control treatments (=1). FIG 13A provides the human T-cell results and FIG 13B provides the monkey PBMC results. As shown in FIGS 13A 13B mab 20H4 9 IgG4 demonstrated costimulatory properties yielding higher levels of IFN-γ in human and monkey cells compared to controls. The level of enhancement of IFN-γ synthesis was comparable to its parental molecule in human and monkey samples.

Subsequently the effect of antibody cross-linking on the functional effect of mab 20H4 9 IgG4 was evaluated. It has been shown that cross linking of antibodies may result in potentiation of their signaling ability. Thus, a study was conducted to determine the functional activity of several batches of mab 20H4 9 IgG4 ± an anti human IgG antibody. As shown in FIG 14A, significant enhancement of IFN-γ synthesis was observed for all lots tested in the absence of cross-linking antibodies, with a plateau at concentrations of 400 ng/ml. The augmentation of IFN-γ synthesis by mab 20H4 9-IgG4 was further enhanced by the addition of anti human IgG cross-linking antibody as shown in FIG 14B. Different batches of mab 20H4.9 IgG4 had comparable cellular activities.

Thus, cross-linking of mab 20H4 9-IgG4 resulted in an enhancement of the ability of the antibody to induce IFN-γ synthesis. Antibody cross linking *in vivo* may

occur by cellular receptors for the Fc portion of immunoglobulins or by antibody dimerization. Mab 20H4 9-IgG4 is of the IgG4 isotype, which, compared to other IgG isotypes, has low affinity for Fc receptors. However IgG4 can bind to FcγRI (CD64) expressed on monocytes and neutrophils

- 5 Two other approaches were used to further characterize mab 20H4 9-IgG4 (i) effect on T-cell survival and (ii) effect on cyclin D2 expression. To determine whether mab 20H4 9-IgG4 could elicit signaling through CD137 on human T-cells and provide co-stimulatory signals to T-cells leading to cell survival and expansion, human T-cells stimulated with anti-CD3 antibodies +/- mab 20H4 9-IgG4 at
- 10 concentrations known to induce IFN-γ synthesis were stained with annexin V and propidium iodide to determine the number of live cells (Annexin V/Propidium iodide negative), and with Cyclin D2 to determine its effect on cell progression FIG 15 shows the average results of 4 different lots of mab 20H4 9-IgG4 on cyclin D2 expression and survival of T-cells. Concentrations of mab 20H4 9-IgG4 of 0.4-10
- 15 μg/ml resulted in an increase in the number of live cells by approximately 1.8-2 fold, and yielded a significant increase in the number of cyclin D2-expressing T-cells (2.5-3 fold)

Example 3 In vivo evaluation of 4-1BB antibodies in a pharmacodynamic model in cynomolgus monkeys

- 20 This example illustrates the ability of mab 20H4 9 IgG4 and mab hu39E3 G4 to enhance the antigen specific immune response elicited by DNA vaccines.

Materials and Methods

- Experimental animal groups Female and male cynomolgus monkeys (2.5 to 5.0 kg) were purchased from Charles River BRF (Houston, Texas) for this study and
- 25 were housed in pairs. Each experimental group consisted of 4 males and 2 females which were randomized into groups by body weight. Experimental groups were as follows

- Group 1 SIV gag and PSA DNA vaccine (2 mg each) day 0 28 56 i.m., plus saline control, i.v., on days 12 15 and 19
- 30 Group 2 SIV gag and PSA DNA vaccine (2 mg each) day 0 28 56 i.m., plus mab hu39E3 G4 i.v. on days 12, 15 and 19

22

Group 3 SIV gag and PSA DNA vaccine (2 mg each), day 0 28, 56 i.m.
plus mab 20H4.9-IgG4 i.v. on days 12, 15 and 19

Group 4 untreated control group

Immunizations and antibody treatments: PSA and SIV gag DNA vaccines
5 were obtained from David B. Weiner, Department of Pathology and Laboratory of
Medicine, University of Pennsylvania. (See, Kim et al. Oncogene 20: 4497-4506
(2001); Muthuman et al., Vaccine 21: 629-637 (2003).)

Monkeys were immunized by the intramuscular route with both PSA and SIV
gag DNA constructs (2 mg/construct/immunization) simultaneously followed by two
10 boosts 4 weeks apart (days 0, 28, and 56). Twelve days after the initial immunization,
treatment with mab 20H4.9-IgG4 or mab hu39E3 G4 was initiated. Antibodies were
administered i.v. at 50 mg/kg on days 12, 15 and 19 after the first immunization.
This schedule was chosen because it was shown to suppress the antibody response to
mab hu39E3 G4.

15 Clinical and Clinical pathology

Throughout the course of the study, physical examinations were conducted on
all monkeys by the attending veterinarians. Blood samples for hematology and serum
chemistry analyses were collected prior to vaccinations and then 12, 42, 70, 97, 134
and 168 days after immunizations.

20 Immunological assays

To determine the effect on the immune responses induced by these therapeutic
regimens, an enzyme-linked immune spot assay (ELISPOT) was used for the
detection of IFN- γ production by antigen specific stimulated lymphocytes. Blood
samples for ELISPOT analyses were collected prior to vaccinations and then 12, 42
25 70, 97, 134 and 168 days after immunizations. Synthetic peptides corresponding to
the complete sequences of SIV gag and the PSA antigen were used for ex vivo
stimulation of PBMC.

Results

Antigen specific IFN- γ secreting cells in response to PSA or SIV gag peptides
30 were quantitated by ELISPOT. FIG. 16 (FIGS. 16A-16D) illustrates the results
obtained from Groups 1-4 respectively. The level of response to PSA was very low
in all groups, indicating that the vaccine by itself did not induce a measurable and

consistent immune response when compared to non-vaccinated animals. On the other hand, SIV gag vaccination alone resulted in significant number of antigen-specific IFN- γ secreting cells that augmented over time (FIG 16A). Untreated animals (not vaccinated) showed 100-1 000 spots/ 10^6 PBMC throughout the course of the study (FIG 16D). These results established the threshold response to the vaccine: animals that presented < 1 000 spots/ 10^6 PBMC were considered non responders. In the group of animals that received vaccine, 5 out of 6 monkeys showed an increased response overtime, with a mean number of spots after the third immunization (day 70) of 1 727 spots/ 10^6 PBMC (SD=242, range=1 403-1 968 spots/ 10^6 PBMC). One monkey was considered a non-responder (620 spots/million PBMC). Since in these studies MHC typing was not done, it is likely that the lack of T cell responses to the vaccine by some monkeys may be due to MHC-mismatch. Remarkably on day 70 4 out of 6 animals treated with SIV gag-plus mab 20H4 9-IgG4 presented a significant higher number of IFN- γ spots (FIG 16C) compared to control animals (FIG 16D) and to macaques that were immunized with DNA vaccine alone (FIG 16A). The mean number of spots after the third immunization for the mab 20H4 9 IgG4-treated group was of 3 465 spots/ 10^6 PBMC (SD=1,236 range=2,070-4 780 spots/ 10^6 PBMC). Two monkeys in that group did not respond to the vaccine (< 800 spots/million PBMC). Following the third immunization (day 70) treatment with mab hu39E3 G4 plus DNA vaccine resulted in 6 out of 6 animals considered as responders with a mean number of spots/ 10^6 PBMC of 2,348 (SD=588 range=1 738-3 283) (FIG 16B). For this group the range of the number of spots was lower compared to those macaques treated with mab 20H4 9-IgG4.

Treatment with both mab 20H4 9-IgG4 and mab hu9E3 G4 was well tolerated and did not result in any significant changes in clinical signs, clinical chemistry or hematological parameters relative to control monkeys.

These data show that mab 20H4 9-IgG4 treatment in combination with a DNA vaccine elicited an *in vivo* enhancement of the magnitude of the specific cellular response to the test antigen relative to controls or to treatment with mab hu39E3 G4 as measured by antigen specific IFN- γ -secreting cells. Since only one dose level of the antibodies and one dosing regimen were used in these preliminary studies, it is unlikely that maximal responses were induced, and further work to optimize

conditions is required. Clearly however even with this non-optimized protocol, an enhancement of the cellular response to test antigens was achieved with mab 20H4 9-IgG4 suggesting that modulation of CD137 function may be an attractive approach for augmenting the effectiveness of DNA vaccines.

5

Although the invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity and understanding, it will be apparent that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims.

CLAIMS

What is claimed is.

- 1 A monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds to 4-1BB comprising a light chain variable region and a heavy chain variable
5 region, wherein
said light chain variable region comprises a CDR1 a CDR2 and a CDR3 as depicted in Figure 4 and
said heavy chain variable region comprises a CDR1 a CDR2, and a CDR3 as depicted in Figure 3
- 10 2 The monoclonal antibody or antigen binding portion thereof of claim 1 wherein.
said light chain comprises a variable region as depicted in Figure 4 and
said heavy chain comprises a variable region as depicted in Figure 3
- 3 A monoclonal antibody comprising a light chain and a heavy chain,
15 wherein said light chain comprises amino acid residues 21-236 of SEQ ID NO 6 and
said heavy chain comprises amino acid residues 20-467 of SEQ ID NO 3
- 4 A pharmaceutical composition comprising
the monoclonal antibody or antigen binding portion thereof of claim 1 and
a pharmaceutically acceptable carrier
- 20 5 A pharmaceutical composition comprising
the monoclonal antibody of claim 3 and
a pharmaceutically acceptable carrier
- 6 A method for treating a cancer in a subject comprising administering a
therapeutically effective amount of the monoclonal antibody or antigen binding
25 portion thereof of claim 1 to said subject.
- 7 An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence that encodes
the amino acid sequence of amino acid residues 20-467 of SEQ ID NO 3
- 8 The polynucleotide of claim 7 that comprises the nucleotide sequence of
SEQ ID NO 1
- 30 9 An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence that encodes
the amino acid sequence of amino acid residues 21-236 of SEQ ID NO 6

85
24

10 The polynucleotide of claim 9 that comprises the nucleotide sequence of
SEQ ID NO 4

25

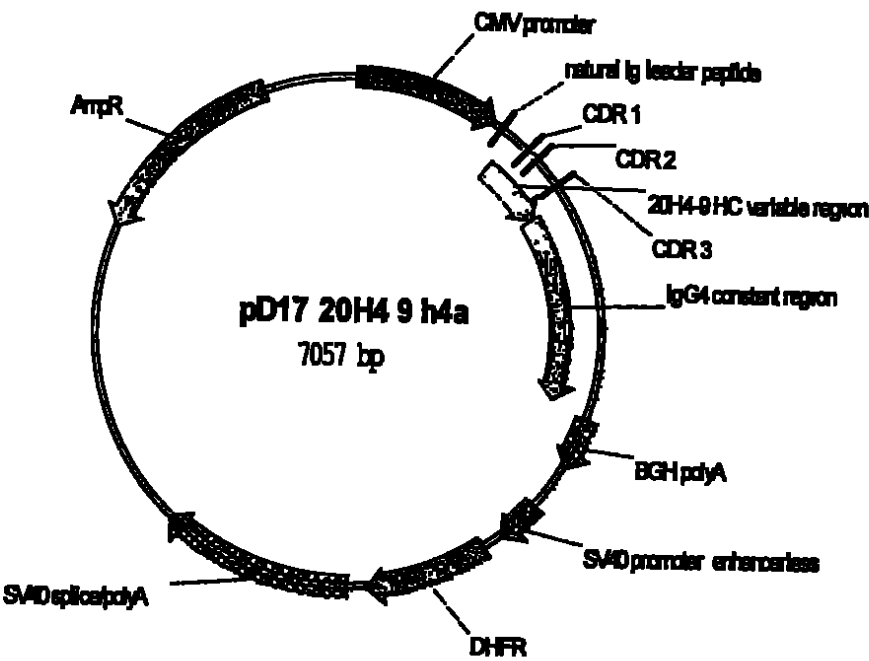


FIG 1

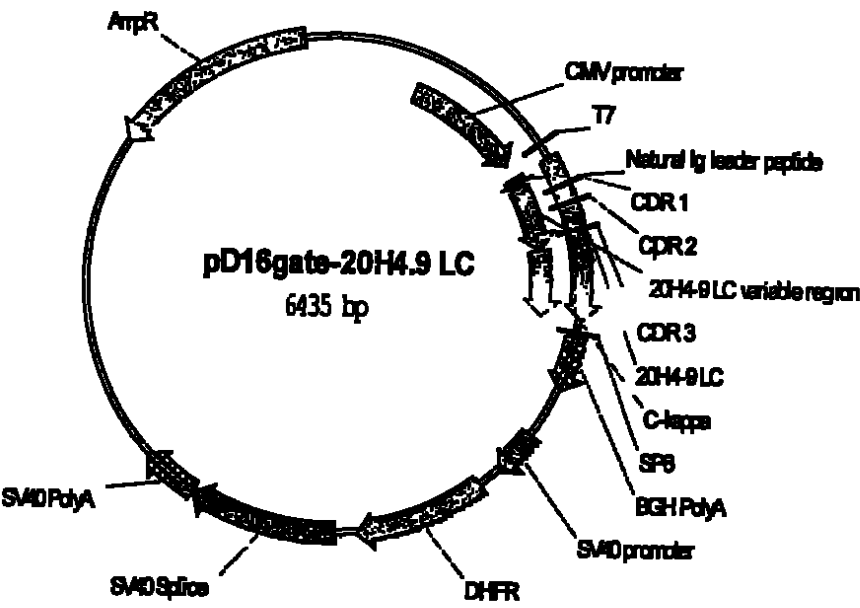


FIG 2

1 CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTTGACA TTGATTATTG ACTAGTTATT
 GCTACATGCC CGGTCTATAT GCGCAACTGT AACTAATAAC TGATCAATAA
 51 AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATATA TATGGAGTTC
 TTATCATTAG TTAATGCCCC AGTAATCAAG TATCGGGTAT ATACCTCAAG
 101 CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA
 GCGCAATGTA TTGAATGCCA TTTACCGGGC GGACCGACTG GCGGGTTGCT
 151 CCCCCGCCCC TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATATA GTAACGCCAA
 GGGGGCGGGT AACTGCAGTT ATTACTGCAT ACAAGGGTAT CATTGCGGTT
 201 TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG GTAAACTGCC
 ATCCCTGAAA GGTAAC TGCA GTTACCCACC TGATAAATGC CATTTGACGG
 251 CACTTGCGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA
 GTGAACCGTC ATGTAGTTCA CATAGTATAC GGTTCAATGCG GGGGATAACT
 301 CGTCAATGAC GGTAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCAG TACATGACCT
 GCAGTTACTG CCATTTACCG GCGGGACCGT AATACGGGTC ATGTACTGGA
 351 TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT
 ATACCCTGAA AGGATGAACC GTCATGTAGA TGCATAATCA GTAGCGATAA
 401 ACCATGGTGA TGCGGTTTGG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT
 TGGTACCACT ACGCCAAAC CGTCATGTAG TTACCCGCAC CTATCGCCAA
 451 TGACTCACGG GGATTTCCTA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT
 ACTGAGTGCC CCTAAAGGTT CAGAGGTGGG GTAAC TGCA GTTACCCCTCAA
 501 TGTTTTGGCA CCAAAATCAA CCGGACTTTC CAAAATGTCT TAACAACCTCC
 ACAAAACCGT GGTTTTAGTT GCCCTGAAAG GTTTTACAGC ATTGTTGAGG
 551 GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCCT GTACGGTGGG AGGTCTATAT
 CGGGGTAACT GCGTTTACCC GCCATCCGCA CATGCCACCC TCCAGATATA
 601 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG
 TTCGTCTCGA GAGACCGATT GATCTCTTGG GTGACGAATG ACCGAATAGC
 ~~~~~  
 M K  
 651 AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTTGGTA CCGCCATGAA  
 TTTAATTATG CTGAGTGATA TCCCTCTGGG TTCGAACCAT GCGGGTACTT  
 natural Ig leader peptide  
 ~~~~~  
 H L W F F L L L V A A P R W V L S
 701 ACACCTGTGG TTCTTCTCC TCCTGGTGGC AGCTCCAGAG TGGGTCTGT
 TGTGGACACC AAGAAGGAGG AGGACCACCG TCGAGGGTCT ACCCAGGACA
 natural Ig leader sequence
 ~~~~  
 20H4-9 HC variable region  
 ~~~~~  
 Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E
 751 CCCAGGTGCA ACTACAGCAG TGGGGCGCAG GACTGTTGAA GCCTTCGGAG
 GGGTCCACGT TGATGTCGTC ACCCCGCGTC CTGACAACTT CGGAAGCCTC
 CDR 1
 ~~~~~  
 20H4-9 HC variable region  
 ~~~~~  
 T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y
 801 ACCCTGTCCC TCACCTGCGC TGTCTATGGT GGGTCCCTCA GTGGTTACTA
 TGGGACAGGG AGTGGACGCG ACAGATACCA CCCAGGAAGT CACCAATGAT
 CDR 1 CDR 2
 ~~~~~  
 20H4-9 HC variable region  
 ~~~~~  
 W S W I R Q S P E K G L E W I G E
 851 CTGGAGCTGG ATACGCCAGT CCCAGAGAA GGGGCTGGAG TGGATTGGGG
 GACCTCGACC TATGCGGTCA GGGGTCTCTT CCCCACCTC ACCTAACCCC

FIG 3A

```

                                CDR 2
                                ~~~~~
                                20H4-9 HC variable region
                                ~~~~~
          I N H G G Y V T Y N P S L E S R
901  AAATCAATCA TGGTGGATAC GTCACCTACA ATCCGTCOCCT CGAGAGTCGA
      TTTAGTTAGT ACCACCTATG CAGTGGATGT TAGGCAGGGA GCTCTCAGCT
                                20H4-9 HC variable region
                                ~~~~~
          V T I S V D T S K N Q F S L K L S
951  GTCACCATAT CAGTAGACAC GTCCAAGAAC CAGTTCTCCC TGAAGCTGAG
      CAGTGGTATA GTCATCTGTG CAGGTTCTTG GTCAAGAGGG ACTTCGACTC
                                CDR 3
                                ~~~~~
                                20H4-9 HC variable region
                                ~~~~~
          S V T A A D T A V Y Y C A R D Y G
1001 CTCTGTGACC GCCGCGGACA CGGCTGTATA TTACTGTGCG AGGGACTATG
      GAGACACTGG CGGCGCCTGT GCGACATAT AATGACACGC TCCCTGATAC
                                CDR 3
                                ~~~~~
                                20H4-9 HC variable region
                                ~~~~~
          P G N Y D W Y F D L W G R G T L
1051 GTCCGGGGAA TTATGACTGG TACTTCGATC TCTGGGGCCG TGGCACCCCTG
      CAGGCCCCCTT AATACTGACC ATGAAGCTAG AGACCCCGGC ACCGTGGGAC
                                IgG4 CH1 domain
                                ~~~~~
                                20H4-9 HC variable region
                                ~~~~~
          V T V S S A S T K G P S V F P L A
1101 GTCACTGTCT CCTCAGCTAG CACCAAGGGC CCATCCGTCT TCCCCCTGGC
      CAGTGACAGA GGAGTCGATC GTGGTTCCCG GGTAGGCAGA AGGGGGACCG
                                IgG4 CH1 domain
                                ~~~~~
                                20H4-9 HC variable region
                                ~~~~~
          P C S R S T S E S T A A L G C L V
1151 GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG
      CGGGACGAGG TCCTCGTGGA GGCTCTCGTG TCGGCGGGAC CCGACGGACC
                                IgG4 CH1 domain
                                ~~~~~
                                20H4-9 HC variable region
                                ~~~~~
          K D Y F P E P V T V S W N S G A
1201 TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC
      AGTTCCCTGAT GAAGGGGCTT GGCCACTGCC ACAGCACCTT GAGTCCGCGG
                                IgG4 CH1 domain
                                ~~~~~
                                20H4-9 HC variable region
                                ~~~~~
          L T S G V H T F P A V L Q S S G L
1251 CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT
      GACTGGTCCG CGCAGTGTG GAAGGGCCGA CAGGATGTCA GGAGTCCTGA
                                IgG4 CH1 domain
                                ~~~~~
                                20H4-9 HC variable region
                                ~~~~~
          Y S L S S V V T V P S S S L G T K
1301 CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACGA
      GATGAGGGAG TCGTCGCACC ACTGGCACGG GAGGTCGTCC AACCCGTGCT

```

FIG 3B

28

IgG4 CH1 domain

1351 T Y T C N V D H K P S N T K V D
 AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC
 TCTGGATGTG GACGTTGCAT CTAGTGTTTCG GGTCGTTGTG GTTCCACCTG
 IgG4 hinge region

IgG4 CH1 domain

1401 K R V E S K Y G P P C P P C P A P
 AAGAGAGTTG AGTCCAAATA TGGTCCACCT TGCCACCTT GCCCAGCACC
 TTCTCTCAAC TCAGGTTTAT ACCAGGTGGA ACGGGTGGAA CGGGTCGTGG
 IgG4 CH2 domain

1451 E F L G G P S V F L F P P K P K D
 TGAGTTCTTG GGGGGACCAT CAGTCTTCCT GTTCCCCCA AAACCCAAGG
 ACTCAAGGAC CCCCCTGGTA GTCAGAAGGA CAAGGGGGGT TTTGGGTTCC
 IgG4 CH2 domain

1501 T L M I S R T P E V T C V V V D
 ACACTCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC
 TGTGAGAGTA CTAGAGGGCC TGGGGACTCC AGTGCACGCA CCACCACCTG
 IgG4 CH2 domain

1551 V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V
 GTGAGCCAGG AAGACCCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGATGGCGT
 CACTCGGTCC TTCTGGGGCT CCAGGTCAAG TTGACCATGC ACCTACCGCA
 IgG4 CH2 domain

1601 E V H N A K T K P R E E Q F N S T
 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA
 CCTCCACGTA TTACGGTTCT GTTTCGGCGC CCTCCTCGTC AAGTTGTCGT
 IgG4 CH2 domain

1651 Y R V V S V L T V L H Q D W L N
 CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAC
 GCATGGCACA CCAGTCGCAG GAGTGGCAGG ACGTGGTCCT GACCGACTTG
 IgG4 CH2 domain

1701 G K E Y K C K V S N K G L P S S I
 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCCTCC CGTCCTCCAT
 CCGTTCTCTA TGTTACGTT CCAGAGGTTG TTTCCGGAGG GCAGGAGGTA
 IgG4 CH3 domain

IgG4 CH2 domain

1751 E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAG CCACAGGTGT
 GCTCTTTTGG TAGAGGTTTC GGTTCCTCGT CGGGGCTCTC GGTGTCCACA
 IgG4 CH3 domain

1801 T L P P S Q E E M T K N Q V S L
 ACACCCTGCC CCCATCCCAG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG
 TGTGGGACGG GGGTAGGGTC CTCTCTACT GGTTCCTGGT CCAGTCGGAC

FIG 3C

IgG4 CH3 domain

1851 T C L V K G F Y P S D I A V E W E
 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTACCCGAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA
 TGGACGGACC AGTTTCCGAA GATGGGGTCG CTGTAGCGGC ACCTCACCTT

IgG4 CH3 domain

1901 S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG
 CTCGTTACCC GTCGGCCTCT TGTGATGTT CTGGTGCGGA GGGCAGGACC

IgG4 CH3 domain

1951 S D G S F F L Y S R L T V D K S
 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA GGCTAACCGT GGACAAGAGC
 TGAGGCTGCC GAGGAAGAAG GAGATGTCGT COGATTGGCA CCTGTTCTCG

IgG4 CH3 domain

2001 R W Q E G N V F S C S V M H E A L
 AGGTGGCAGG AGGGGAATGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
 TCCACCGTCC TCCCCTTACA GAAGAGTACG AGGCACTACG TACTCCGAGA

IgG4 CH3 domain

2051 H N H Y T Q K S L S L S L G K
 GCACAACCAC TACACACAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCTG GGTAAATGAT
 CGTGTGTTGGT ATGTGTGTCT TCTCGGAGAG GGACAGAGAC CCATTTACTA

2101 CTAGAGGGCC CTATTCTATA GTGTCACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC
 GATCTCCCGG GATAAGATAT CACAGTGGAT TTACGATCTC GAGCGACTAG

2151 AGCCTCGACT GTGCCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCCCTCCC
 TCGGAGCTGA CACGGAAGAT CAACGGTCGG TAGACAACAA ACGGGGAGGG

2201 CCGTGCCCTT CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCACTGT CCTTTCCTAA
 GGCACGGGAG GAACCTGGGAC CTTCCACGGT GAGGGTGACA GGAAAGGATT

2251 TAAATGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT
 ATTTTACTCC TTTAACGTAG CGTAACAGAC TCATCCACAG TAAGATAAGA

2301 GGGGGGTGGG GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA
 CCCCCACCC CACCCCGTCC TGTCGTTCCC CCTCCTAAC CTTCTGTTAT

2351 GCAGGCATGC TGGGGATGCG GTGGGCTCTA TGGCTTCTGA GGCAGGAAAGA
 CGTCCGTACG ACCCCTACGC CACCCGAGAT ACCGAAGACT CCGCCTTTCT

2401 ACCAGCTGGG GCTCTAGGGG GTATCCCCAC GCGCCCTGTA GCGGCGCATT
 TGGTCGACCC CGAGATCCCC CATAGGGGTG CGCGGGACAT CGCGCGGTAA

2451 AAGCGCGCGG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG CGTGACCGCT ACACTTGCCA
 TTCGCGCCGC CCACACCACC AATGCGCGTC GCACTGGCGA TGTGAACGGT

2501 GCGCCCTAGC GCGCGCTCCT TTCGCTTTCT TCCCTTCCTT TCTCGCCACG
 CGCGGGATCG CGGGCGAGGA AAGCGAAGA AGGGAAGGAA AGAGCGGTGC

2551 TTCGCCGGGC CTCTCAAAAA AGGGAAAAAA AGCATGCATC TCAATTAGTC
 AAGCGGCCCG GAGAGTTTTT TCCCTTTTTT TCGTACGTAG AGTTAATCAG

2601 AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC CTAATCCGC
 TCGTTGGTAT CAGGGCGGGG ATTGAGGCGG GTAGGGCGGG GATTGAGGCG

2651 CCAGTTCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTTAT
 GGTCAAGGCG GGTAAGAGGC GGGGTACCGA CTGATTAAAA AAAATAAATA

2701 GCAGAGGCCG AGGCCGCTC GGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG
 CGTCTCCGGC TCCGGCGGAG CCGGAGACTC GATAAGGTCT TCATCACTCC

2751 AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AAAGCTTGGA CAGCTCAGGG
 TCCGAAAAAA CCTCCGATC CGAAAACGTT TTTCGAACCT GTCGAGTCCC

2801 CTGCGATTTT GCGCCAAACT TGACGGCAAT CCTAGCGTGA AGGCTGGTAG
 GACGCTAAAG CGCGGTTTGA ACTGCCGTTA GGATCGCACT TCCGACCATC

FIG 3D

2851 GATTTTATCC CCGCTGCCAT CATGGTTCGA CCATTGAACT GCATCGTCGC
CTAAAATAGG GCGGACGGTA GTACCAAGCT GGTAACCTGA CGTAGCAGCG
2901 CGTGTCCCAA AATATGGGGA TTGGCAAGAA CGGAGACCTA CCCTGGCCTC
GCACAGGGTT TTATACCCCT AACCGTTCTT GCCTCTGGAT GGGACCGGAG
2951 CGCTCAGGAA CGAGTTCAAG TACTTCCAAA GAATGACCAC AACCTCTTCA
GCGAGTCCTT GCTCAAGTTC ATGAAGGTTT CTTACTGGTG TTGGAGAAGT
3001 GTGGAAGGTA AACAGAATCT GGTGATTATG GGTAGGAAAA CCTGGTTCTC
CACCTTCCAT TTGTCTTAGA CCACTAATAC CCATCCTTTT GGACCAAGAG
3051 CATTCTTGAG AAGAATCGAC CTTTAAAGGA CAGAATTAAT ATAGTTCTCA
GTAAGGACTC TTCTTAGCTG GAAATTTCTT GTCTTAATTA TATCAAGAGT
3101 GTAGAGAACT CAAAGAACCA CCACGAGGAG CTCATTTTCT TGCCAAAAGT
CATCTCTTGA GTTTCTTGGT GGTGCTCCTC GAGTAAAAGA ACGGTTTTCA
3151 TTGGATGATG CCTTAAGACT TATTGAACAA CCGGAATTGG CAAGTAAAGT
AACCTACTAC GGAATTCTGA ATAACCTGTT GGCTTAACC GTTCATTTCA
3201 AGACATGGTT TGGATAGTCG GAGGCAGTTC TGTTTACCAG GAAGCCATGA
TCTGTACCAA ACCTATCAGC CTCCGTCAAG ACAAATGGTC CTTCCGTACT
3251 ATCAACCAGG CCACCTTAGA CTCTTTGTGA CAAGGATCAT GCAGGAATTT
TAGTTGGTCC GGTGGAATCT GAGAAACACT GTTCCTAGTA CGTCCTTAAA
3301 GAAAGTGACA CGTTTTTCCC AGAAATTGAT TTGGGGAAAT ATAACTTCT
CTTTCAGTGT GCAAAAAGGG TCTTTAACTA AACCCCTTA TATTTGAAGA
3351 CCCAGAATAC CCAGGCGTCC TCTCTGAGGT CCAGGAGGAA AAAGGCATCA
GGGTCTTATG GGTCCGCAGG AGAGACTCCA GGTCTCTCTT TTTCCGTAGT
3401 AGTATAAGTT TGAAGTCTAC GAGAAGAAAG ACTAACAGGA AGATGCTTTC
TCATATTCAA ACTTCAGATG CTCTTCTTTC TGATTGTCTT TCTACGAAAG
3451 AAGTTCTCTG CTCCCTCCT AAAGCTATGC ATTTTATATA GACCATGGGA
TTCAAGAGAC GAGGGGAGGA TTTCGATACG TAAAAATATT CTGGTACCCT
3501 CTTTTGCTGG CTTTAGATCT CTTTGTGAAG GAACCTTACT TCTGTGGTGT
GAAAACGACC GAAATCTAGA GAAACACTTC CTTGGAATGA AGACACCACA
3551 GACATAATTG GACAACTAC CTACAGAGAT TTAAAGCTCT AAGGTAAATA
CTGTATTAACT CTGTTTGATG GATGTCTCTA AATTTCGAGA TTCCATTTAT
3601 TAAATTTTTT AAGTGTATAA TGTGTTAAAC TACTGATTCT AATTGTTTGT
ATTTTAAAAA TTCACATATT ACACAATTTG ATGACTAAGA TTAACAAACA
3651 GTATTTTAGA TTCCAACCTA TGGAAGTATG GAATGGGAGC AGTGGTGGAA
CATAAATCT AAGGTTGGAT ACCTTGACTA CTTACCCCTG TCACCACCTT
3701 TGCTTTTAAAT GAGGAAAACC TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG
ACGGAAATTA CTCCTTTTGG ACAAACGAG TCTTCTTTAC GGTAGATCAC
3751 ATGATGAGGC TACTGCTGAC TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAAG
TACTACTCCG ATGACGACTG AGAGTTGTAA GATGAGGAGG TTTTTCTTC
3801 AGAAAGGTAG AAGACCCCAA GGACTTTCCT TCAGAATTGC TAAGTTTTTT
TCTTTCCATC TTCTGGGGTT CCTGAAAGGA AGTCTTAACG ATTCAAAAA
3851 GAGTCATGCT GTGTTTAGTA ATAGAACTCT TGCTTGCTTT GCTATTTACA
CTCAGTACGA CACAAATCAT TATCTTGAGA ACGAACGAAA CGATAAATGT
3901 CCACAAAGGA AAAAGCTGCA CTGCTATACA AGAAAATTAT GGAAAAATAT
GGTGTTCCTT TTTTCGACGT GACGATATGT TCTTTTAATA CCTTTTATA
3951 TCTGTAACCT TTATAAGTAG GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGT
AGACATTGGA AATATTATC CGTATTGTCA ATATTAGTAT TGTATGACAA
4001 TTTTCTTACT CCACACAGGC ATAGAGTGTC TGCTATTAAT AACTATGCTC
AAAAGAATGA GGTGTGTCCG TATCTCACAG ACGATAATTA TTGATACGAG
4051 AAAAATTGTG TACCTTTAGC TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA
TTTTTAACAC ATGGAAATCG AAAAATTAAA CATTTCCCA ATTATTCCTT
4101 TATTTGATGT ATAGTGCTT GACTAGAGAT CATAATCAGC CATACCACAT
ATAAATAACA TATCACGGAA CTGATCTCTA GTATTAGTCG GTATGGTGTA
4151 TTGTAGAGGT TTTACTTGCT TAAAAAACC TCCCACACCT CCCCCTGAAC
AACATCTCCA AAATGAACGA AATTTTTTGG AGGGTGTGGA GGGGGACTTG
4201 CTGAAACATA AAATGAATGC AATTGTTGTT GTTAACTTGT TTATTGCAGC

FIG 3E

31

4251	GACTTTGTAT	TTTACTTACG	TTAACAACAA	CAATTGAACA	AATAACGTCG
	TTATAATGGT	TACAAATAAA	GCAANTAGCAT	CACAAATTTC	ACAAATAAAG
	AATATTACCA	ATGTTTATTT	CGTTATCGTA	GTGTTTAAAG	TGTTTATTTT
4301	CATTTTTTTT	ACTGCATTCT	AGTTGTGGTT	TGTCCAAACT	CATCAATGTA
	GTAAAAAAG	TGACGTAAGA	TCAACACCAA	ACAGGTTTGA	GTAGTTACAT
4351	TCTTATCATG	TCTGGATCGG	CTGGATGATC	CTCCAGCGCG	GGGATCTCAT
	AGAATAGTAC	AGACCTAGCC	GACCTACTAG	GAGGTCGCGC	CCCTAGAGTA
4401	GCTGGAGTTC	TTGCCCCACC	CCAAC TTGTT	TATTGCAGCT	TATAATGGTT
	CGACCTCAAG	AAGCGGGTGG	GGTTGAACAA	ATAACGTCGA	ATATTACCAA
4451	ACAAATAAAG	CAATAGCATC	ACAAATTTC	CAATAAAGC	ATTTTTTTCA
	TGTTTATTTT	GTTATCGTAG	TGTTTAAAGT	GTTTATTTTC	TAAAAAAGT
4501	CTGCATTCTA	GTTGTGGTTT	GTCCAAACTC	ATCAATGTAT	CTTATCATGT
	GACGTAAGAT	CAACACCAA	CAGGTTTGAG	TAGTTACATA	GAATAGTACA
4551	CTGTATACCG	TCGACCTCTA	GCTAGAGCTT	GGCGTAATCA	TGGTCATAGC
	GACATATGGC	AGCTGGAGAT	CGATCTCGAA	CCGCATTAGT	ACCAGTATCG
4601	TGTTTCCTGT	GTGAAATTGT	TATCCGCTCA	CAATTCCACA	CAACATACGA
	ACAAAGGACA	CAC TTTAACA	ATAGGCGAGT	GTTAAGGTGT	GTTGTATGCT
4651	GCCGGAAGCA	TAAAGTGTA	AGCCTGGGGT	GCCTAATGAG	TGAGCTAACT
	CGGCCTTCGT	ATPTCACATT	TCGGACCCCA	CGGATTACTC	ACTCGATTGA
4701	CACATTAAAT	GCGTTGCGCT	CACTGCCCGC	TTTCCAGTCG	GGAAACCTGT
	GTGTAATTAA	CGCAACGCGA	GTGACGGGCG	AAAGGTCAGC	CCTTTGGACA
4751	CGTGCCAGCT	GCATTAATGA	ATCGGCCAAC	GCGCGGGGAG	AGGCGGTTTG
	GCACGGTCGA	CGTAATTACT	TAGCCGGTTG	CGCGCCCTC	TCCGCCAAAC
4801	CGTATTGGGC	GCTCTTCCGC	TTCTTCGCTC	ACTGACTCGC	TCCGCTCGGT
	GCATAACCCG	CGAGAAGCGG	AAGGAGCGAG	TGACTGAGCG	ACGCGAGCCA
4851	CGTTCCGGTG	CGGCGAGCGG	TATCAGCTCA	CTCAAAGGCG	GTAATACGGT
	GCAAGCCGAC	GCCGCTCGCC	ATAGTCGAGT	GAGTTTCCGC	CATTATGCCA
4901	TATCCACAGA	ATCAGGGGAT	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAAGGC
	ATAGGTGTCT	TAGTCCCTTA	TTGCGTCCTT	TCTTGATAC	TCGTTTTCCG
4951	CAGCAAAAGG	CCAGGAACCG	TAAAAAGGCC	GCGTTGCTGG	CGTTTTTCCA
	GTCGTTTTCC	GGTCCTTGGC	ATTTTTCCGG	CGCAACGACC	GCAAAAGGT
5001	TAGGCTCCGC	CCCCCTGACG	AGCATCACAA	AAATCGACGC	TCAAGTCAGA
	ATCCGAGGCG	GGGGGACTGC	TCGTAGTGTT	TTTAGCTGCG	AGTTCAGTCT
5051	GGTGGCGAAA	CCCGACAGGA	CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT	TCCCCCTGGA
	CCACCGCTTT	GGGCTGTCTT	GATATTTCTA	TGGTCCGCAA	AGGGGGACCT
5101	AGCTCCCTCG	TGCGCTCTCC	TGTTCCGACC	CTGCCGCTTA	CCGGATACCT
	TCGAGGGAGC	ACGCGAGAGG	ACAAGGCTGG	GACGGCGAAT	GGCCTATGGA
5151	GTCCGCTCTT	CTCCCTTCGG	GAAGCGTGGC	GCTTTCTCAA	TGCTCACGCT
	CAGGCGGAAA	GAGGGAAGCC	CTTCGCACCG	CGAAAGAGTT	ACGAGTGCGA
5201	GTAGGTATCT	CAGTTCGGTG	TAGGTCGTTT	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG
	CATCCATAGA	GTCAAGCCAC	ATCCAGCAAG	CGAGGTTTGA	CCCGACACAC
5251	CACGAACCCC	CCGTTTCAGCC	CGACCGCTGC	GCCTTATCCG	GTAAGTATCG
	GTGCTTGGGG	GGCAAGTCGG	GCTGGCGACG	CGGAATAGGC	CATTGATAGC
5301	TCTTGAGTCC	AACCCGGTAA	GACACGACTT	ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA
	AGAACTCAGG	TTGGGCCATT	CTGTGCTGAA	TAGCGGTGAC	CGTCGTCCGT
5351	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA	GCGAGGTATG	TAGGCGGTGC	TACAGAGTTC
	GACCATTTGC	CTAATCGTCT	CGCTCCATAC	ATCCGCCACG	ATGTCTCAAG
5401	TTGAAGTGGT	GGCCTAACTA	CGGCTACACT	AGAAGGACAG	TATTTGGTAT
	AACTTCACCA	CCGGATTGAT	GCCGATGTGA	TCTTCCTGTC	ATAAACCATA
5451	CTGCGCTCTG	CTGAAGCCAG	TTACCTTCGG	AAAAAGAGTT	GGTAGCTCTT
	GACGCGAGAC	GACTTCGGTC	AATGGAAGCC	TTTTTCTCAA	CCATCGAGAA
5501	GATCCGGCAA	ACAAACCACC	GCTGGTAGCG	GTGGTTTTTT	TGTTTGCAAG
	CTAGGCCGTT	TGTTTGGTGG	CGACCATCGC	CACCAAAAAA	ACAAACGTTT
5551	CAGCAGATTA	CGCGCAGAAA	AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT
	GTCGTCTAAT	GCGCGTCTTT	TTTTCTCTAG	GTTCTTCTAG	GAAACTAGAA

FIG 3F

5601 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACCTCACGT TAAGGGATTT
AAGATGCCCC AGACTGCGAG TCACCTTGCT TTTGAGTGCA ATTCCCTAAA
5651 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
ACCACTACTC TAATAGTTTT TCCTAGAAGT GGATCTAGGA AAATTTAATT
5701 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
TTTACTTCAA AATTTAGTTA GATTTTCATAT ATACTCATTT GAACCAGACT
5751 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
GTCATGCGTT ACGAATTAGT CACTCCGTGG ATAGAGTCGC TAGACAGATA
5801 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
AAGCAAGTAG GTATCAACGG ACTGAGGGGC AGCACATCTA TTGATGCTAT
5851 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
GCCCTCCCGA ATGGTAGACC GGGGTCACGA CGTTACTATG GCGCTCTGGG
5901 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
TGCGAGTGGC CGAGGTCTAA ATAGTCGTTA TTTGGTCGGT CGGCCCTOCC
5951 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
GGCTCGCGTC TTCACCAGGA CGTTGAAATA GCGGAGGTA GGTCAGATAA
6001 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
TTAACAACGG CCTTCGATC TCATTCATCA AGCGGTCAAT TATCAAACGC
6051 CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
GTTGCAACAA CGGTAACGAT GTCCGTAGCA CCACAGTCCG AGCAGCAAAC
6101 GTATGGCTTC ATTCACTCC GGTTCCTAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
CATACCGAAG TAAGTCGAGG CCAAGGGTTG CTAGTTCCGC TCAATGTACT
6151 TCCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
AGGGGGTACA ACACGTTTTT TCGCCAATCG AGGAAGCCAG GAGGCTAGCA
6201 TGTCAGAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGT ATGGCAGCAC
ACAGTCTTCA TTCAACCGG GTCAACAATAG TGAGTACCAA TACCGTCGTG
6251 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
ACGTATTAAG AGAATGACAG TACGGTAGGC ATTCTACGAA AAGACACTGA
6301 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG
CCTCTCATGA GTTGGTTTCA TAAGACTCTT ATCACATACG CCGCTGGCTC
6351 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
AACGAGAAGG GGCCGAGTT ATGCCCTATT ATGGCGCGGT GTATCGTCTT
6401 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGGGGGCG AAAACTCTCA
GAAATTTTCA CGAGTAGTAA CCTTTTGCAA GAAGCCCCGC TTTTGAGAGT
6451 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
TCCTAGAATG GCGACAATC TAGGTCAAGC TACATTGGGT GAGCACGTGG
6501 CAACCTGATC TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
GTTGACTAGA AGTCGTAGAA AATGAAAGTG GTCGCAAGA CCCACTCGTT
6551 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
TTTGTCCTTC CGTTTTACGG CGTTTTTTCC CTTATTCCCG CTGTGCCTTT
6601 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
ACAACTTATG AGTATGAGAA GGAAAAGTT ATAATAACTT CGTAAATAGT
6651 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
CCCAATAACA GAGTACTCGC CTATGTATAA ACTTACATAA ATCTTTTTAT
6701 AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCQC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
TTGTTTATCC CCAAGGCGCG TGTAAGGGG CTTTTACGG TGGACTGCAG
6751 GACGGATCGG GAGATCTGCT AGGTGACCTG AGGCGCGCGG GCTTCGAATA
CTGCCTAGCC CTCTAGACGA TCCACTGGAC TCCGCGCGGC CGAAGCTTAT
6801 GCCAGAGTAA CCTTTTTTTT TAATTTTATT TTATTTTATT TTTGAGATGG
CGGTCTCATT GGAAAAAAA ATTAAATAA AATAAAATAA AAACCTCTACC
6851 AGTTTGCGCG CGATCTCCCG ATCCCTATG GTCGACTCTC AGTACAATCT
TCAAACCGCG GCTAGAGGGC TAGGGGATAC CAGCTGAGAG TCATGTTAGA
6901 GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATC TGCTCCCTGC TTGTGTGTTG
CGAGACTACG GCGTATCAAT TCGGTCATAG ACGAGGGACG AACACACAAC
6951 GAGGTGCGTG AGTAGTGCGC GAGCAAAATT TAAGCTACAA CAAGGCAAGG

FIG 3G

7001 CTCCAGCGAC TCATCACGCG CTCGTTTTAA ATTCGATGTT GTTCCGTTCC
CTTGACCGAC AATTGCATGA AGAATCTGCT TAGGGTTAGG CGTTTTGCGC
7051 GAACTGGCTG TTAACGTACT TCTTAGACGA ATCCCAATCC GCAAAACGCG
TGCTTCG
ACGAAGC

FIG 3H

34

```

1   GACGGATCGG GAGATCTGCT AGCCCGGGTG ACCTGAGGCG CGCCGGCTTC
   CTGCCTAGCC CTCTAGACGA TCGGGCCCAC TGGACTCCGC GCGGCCGAAG
51  GAATAGCCAG AGTAACCTTT TTTTAAATT TTATTTTATT TTATTTTGA
   CTTATCGGTC TCATTGGAAA AAAAAATTAA AATAAAATAA AATAAAACT
101 GATGGAGTTT GGCGCCGATC TCCCGATCCC CTATGGTCGA CTCTCAGTAC
   CTACCTCAAA CCGCGGCTAG AGGGCTAGGG GATACCAGCT GAGAGTCATG
151 AATCTGCTCT GATGCCGAT AGTTAAGCCA GTATCTGCTC CCTGCTTGTG
   TTAGACGAGA CTACGGCGTA TCAATTCGGT CATAGACGAG GGACGAACAC
201 TGTTGGAGGT CGCTGAGTAG TGCGCGAGCA AAATTTAAGC TACAACAAGG
   ACAACCTCCA GCGACTCATC ACGCGCTCGT TTAAATTCG ATGTTGTTCC
251 CAAGGCTTGA CCGACAATTG CATGAAGAAT CTGCTTAGGG TTAGGCGTTT
   GTTCCGAACG GGCTGTTAAC GTACTTCTTA GACGAATCCC AATCCGCAA
301 TGCGCTGCTT CGCGATGTAC GGGCCAGATA TACGCGTTGA CATTGATTAT
   ACGCGACGAA GCGCTACATG CCCGGTCTAT ATGCGCAACT GTAACATA
351 TGGATGCTTA TTAATAGTAA TCAATTACGG GGTCAATAGT TCATAGCCCA
   ACTGATCAAT AATTATCATT AGTTAATGCC CCAGTAATCA AGTATCGGGT
401 TATATGGAGT TCCGCGTTAC ATAACCTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG
   ATATACCTCA AGGCGCAATG TATTGAATGC CATTTACCGG GCGGACCGAC
451 ACCGCCCCAAC GACCCCCGCC CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA
   TGGCGGGTTG CTGGGGGCGG GTAACGTCAG TTATTACTGC ATACAAGGGT
501 TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA
   ATCATTGCGG TTATCCCTGA AAGGTAACG CAGTTACCCA CCTCATAAAT
551 CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC
   GCCATTTGAC GGGTGAACCG TCATGTAGTT CACATAGTAT ACGGTTTCATG
601 GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CATTATGCCC
   CGGGGGATAA CTGCAGTTAC TGCCATTTAC CGGGCGGACC GTAATACGGG
651 AGTACATGAC CTTATGGGAC TTTCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA
   TCATGTACTG GAATACCCTG AAAGGATGAA CCGTCATGTA GATGCATAAT
701 GTCATCGCTA TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG
   CAGTAGCGAT AATGGTACCA CTACGCCAAA ACCGTCATGT AGTTACCCGC
751 TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC CCCATTGACG
   ACCTATCGCC AAAGTGAGTG CCCCTAAAGG TTCAGAGGTG GGGTAACTGC
801 TCAATGGGAG TTTGTTTTGG CACCAAAATC AACGGGACTT TCCAAAATGT
   AGTTACCCCTC AAACAAAACC GTGGTTTTAG TTGCCCTGAA AGGTTTTACA
851 CGTAACAATG CCGCCCCATT GACGCAATG GCGGGTAGGC GTGTACGGTG
   GCATTGTTGA GCGGGGGTAA CTGCGTTTAC CCGCCATCCG CACATGCCAC
901 GGAGGTCTAT ATAAGCAGAG CTCTCTGGCT AACTAGAGAA CCCACTGCTT
   CCTCCAGATA TATTCGTCTC GAGAGACCGA TTGATCTCTT GGGTGACGAA
951 ACTGGCTTAT CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGAGAC CCAAGCTTAT
   TGACCGAATA GCTTTAATTA TGCTGAGTGA TATCCCTCTG GGTTCGAATA
                                     Natural Ig leader
                                     ~~~~~~
                                     M E A P A Q
1001 CAACAAGTTT GTACAAAAA GCAGGCTGGT ACCATGGAAG CCCAGCTCA
   GTTGTTCAAA CATGTTTTTT CGTCCGACCA TGGTACCTTC GGGGTCGAGT
                                     ~~~~~~
                                     Natural Ig leader peptide
                                     ~~~~~~
                                     L L F L L L L W L P D T T G E I V
1051 GCTTCTCTTC CTCCTGCTAC TCTGGCTCCC AGATACCACC GGAGAAATTG
   CGAAGAGAAG GAGGACGATG AGACCGAGGG TCTATGGTGG CCTCTTTAAC
```

FIG 4A

11/29

35

```

                20H4-9 LC variable region
                ~~~~~
      1101      L T Q   S P A   T L S L   S P G   E R A
                TGTTGACACA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTT TGTCTCCAGG GGAAAGAGCC
                ACAACTGTGT CAGAGGTCGG TGGGACAGAA ACAGAGGTCC CCTTTCGCG
                20H4-9 LC variable region
                ~~~~~
                        CDR 1
                        ~~~~~
      1151      T L S C   R A S   Q S V   S S Y L   A W Y
                ACCCTCTCCT GCAGGGCCAG TCAGAGTGTT AGCAGCTACT TAGCCTGGTA
                TGGGAGAGGA CGTCCCGGTC AGTCTCACAA TCGTCGATGA ATCGGACCAT
                20H4-9 LC variable region
                ~~~~~
                        CDR 2
                        ~~~~~
      1201      Q Q K   P G Q A   P R L   L I Y   D A S N
                CCAACAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GATGCATCCA
                GGTGTCTTTT GGACCGGTCC GAGGGTCCGA GGAGTAGATA CTACGTAGGT
                20H4-9 LC variable region
                ~~~~~
                        CDR 2
                        ~~~~~
      1251      R A T   G I P   A R F S   G S G   S G T
                ACAGGGCCAC TGGCATCCCA GCCAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA
                TGTCCCGGTG ACCGTAGGGT CGGTCCAAGT CACCGTCACC CAGACCCGT
                20H4-9 LC variable region
                ~~~~~
      1301      D F T L   T I S   S L E   P E D F   A V Y
                GACTTCACTC TCACCATCAG CAGCCTAGAG CCTGAAGATT TTGCAGTTTA
                CTGAAGTGAG AGTGGTAGTC GTCGGATCTC GGACTTCTAA AACGTCAAAT
                CDR 3
                ~~~~~
                20H4-9 LC variable region
                ~~~~~
      1351      Y C Q   Q R S N   W P P   A L T   F G G G
                TTA CTGT CAG CAGCGTAGCA ACTGGCCTCC GCGCTCACT TTCGGCGGAG
                AATGACAGTC GTCGCATCGT TGACCGGAGG CCGCGAGTGA AAGCCGCCTC
                C-kappa
                ~~~~~
                20H4-9 LC variable region
                ~~~~~
      1401      T K V   E I K   R T V A   A P S   V F I
                GGACCAAGGT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC
                CCTGGTTCCA CCTCTAGTTT GCATGCCACC GACGTGGTAG ACAGAAGTAG
                C-kappa
                ~~~~~
      1451      F P P S   D E Q   L K S   G T A S   V V C
                TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG
                AAGGGCGGTA GACTACTCGT CAACTTTAGA CCTTGACGGA GACAACACAC
                C-kappa
                ~~~~~
      1501      L L N   N F Y P   R E A   K V Q   W K V D
                CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG
                GGACGACTTA TTGAAGATAG GGTCTCTCCG GTTTCATGTC ACCTTCCACC

```

FIG 4B

C-kappa

~~~~~

1551    N A L Q S G N S Q E S V T E Q D  
ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC  
TATTGCGGGA GGTAGCCCA TTGAGGGTCC TCTCACAGTG TCTCGTCTG

C-kappa

~~~~~

1601 S K D S T Y S L S S T L T L S K A
AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCGTGACGC TGAGCAAAGC
TCGTTCTGT CGTGGATGTC GGAGTCGTG TGGGACTGCG ACTCGTTTCG

C-kappa

~~~~~

1651    D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L  
AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC  
TCTGATGCTC TTTGTGTTTC AGATGCGGAC GCTTCAGTGG GTAGTCCCGG

C-kappa

~~~~~

1701 S S P V T K S F N R G E C
TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTAGACCCAG
ACTCGAGCGG GCAGTGTTC TCGAAGTTGT CCCCTCTCAC AATCTGGGTC

1751 CTTTCTTGTA CAAAGTGGT GATCTAGAGG GCCCTATTCT ATAGTGTAC
GAAAGAACAT GTTTCACCA CTAGATCTCC CGGATAAGA TATCACAGTG

1801 CTAAATGCTA GAGCTCGCTG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA
GATTTACGAT CTCGAGCGAC TAGTCGGAGC TGACACGGAA GATCAACGGT

1851 GCCATCTGTT GTTTGCCCCC CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG
CGGTAGACAA CAAACGGGGA GGGGGCACGG AAGGAAGTGG GACCTTCCAC

1901 CCACTCCAC TGTCTTTCC TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT
GGTGAGGGTG ACAGGAAAGG ATTATTTTAC TCCTTTAACG TAGCGTAACA

1951 CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT GGGGTGGGGC AGGACAGCAA
GACTCATCCA CAGTAAGATA AGACCCCCCA CCCCACCCCG TCCTGTCGTT

2001 GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT GCGGTGGGCT
CCCCCTCCTA ACCCTTCTGT TATCGTCCGT ACGACCCCTA CGCCACCCGA

2051 CTATGGCTTC TGAGGCGGAA AGAACCAGCT GGGGCTCTAG GGGGTATCCC
GATACCGAAG ACTCCGCCTT TCTTGGTCGA CCCCAGATC CCCCATAGGG

2101 CACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAAGCGC GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
GTGCGCGGGA CATCGCCGCG TAATTCGCGC CGCCGACACC ACCAATGCGC

2151 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT
GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTGCGGGGA TCGCGGGCGA GGAAAGCGAA

2201 TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GGCCTCTCAA AAAAGGGAAA
AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGCAAGCGGC CCGGAGAGTT TTTTCCCTTT

2251 AAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC
TTTTCGTACG TAGAGTTAAT CAGTCGTTGG TATCAGGGCG GGGATTGAGG

2301 GCCCATCCCG CCCCTAACTC CGCCAGTTC CGCCATTCT CCGCCCCATG
CGGGTAGGGC GGGGATTGAG GCGGGTCAAG GCGGGTAAGA GCGGGGTAC

2351 GCTGACTAAT TTTTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT
CGACTGATTA AAAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGGAGA

2401 GAGCTATTCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG
CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG ATCCGAAAAC

2451 CAAAAAGCTT GGGGGGACAG CTCAGGGCTG CGATTTGCGC CCAAACTTGA
GTTTTTCGAA CCCCCCTGTC GAGTCCCGAC GCTAAAGCGC GGTTTGAAC

2501 CGGCAATCCT AGCGTGAAGG CTGGTAGGAT TTTATCCCG CTGCCATCAT
GCCGTTAGGA TCGCACTTCC GACCATCCTA AAATAGGGGC GACGGTAGTA

2551 GGTTGACCA TTGAACTGCA TCGTCGCCGT GTCCCAAAT ATGGGGATTG
CCAAGCTGGT AACTTGACGT AGCAGCGGCA CAGGGTTTTA TACCCCTAAC

FIG 4C

2601 GCAAGAACGG AGACCTACCC TGGCCTCCGC TCAGGAACGA GTTCAAGTAC
CGTTCTTGCC TCTGGATGGG ACCGGAGGCG AGTCCTTGCT CAAGTTCATG
2651 TTCCAAAGAA TGACCACAAC CTCTTCAGTG GAAGGTAAAC AGAATCTGGT
AAGGTTTCTT ACTGGTGTTG GAGAAGTCAC CTTCCATTG TCTTAGACCA
2701 GATTATGGGT AGGAAAACCT GGTTCTCCAT TCCTGAGAG AATCGACCTT
CTAATACCCA TCCTTTTGGA CCAAGAGGTA AGGACTCTTC TTAGCTGGAA
2751 TAAAGGACAG AATTAATATA GTTCTCAGTA GAGAACTCAA AGAACCACCA
ATTTCTGTG TTAATTATAT CAAGAGTCAT CTCTTGAGTT TCTTGGTGGT
2801 CGAGGAGCTC ATTTTCTTGC CAAAAGTTTG GATGATGCCT TAAGACTTAT
GCTCCTCGAG TAAAAGAACG GTTTTCAAAC CTACTACGGA ATTCTGAATA
2851 TGAACAACCG GAATTGGCAA GTAAAGTAGA CATGGTTTGG ATAGTCGGAG
ACTTGTTGGC CTTAACCGTT CATTTTCATCT GTACCAAACC TATCAGCCTC
2901 GCAGTTCTGT TTACCAGGAA GCCATGAATC AACCAGGCCA CCTCAGACTC
CGTCAAGACA AATGGTCCTT CGGTACTTAG TTGGTCCGGT GGAGTCTGAG
2951 TTTGTGACAA GGATCATGCA GGAATTTGAA AGTGACACGT TTTTCCCAGA
AAACACTGTT CCTAGTACGT CCTTAAACTT TCACTGTGCA AAAGGGTCT
3001 AATTGATTTG GGGAAATATA AACTTCTCCC AGAATACCCA GCGTCTCTCT
TTAACTAAAC CCCTTTATAT TTGAAGAGGG TCTTATGGGT CCGCAGGAGA
3051 CTGAGGTCCA GGAGGAAAAA GGCATCAAGT ATAAGTTTGA AGTCTACGAG
GACTCCAGGT CCTCCTTTTT CCGTAGTTCA TATTCAAAC TCAGATGCTC
3101 AAGAAAGACT AACAGGAAGA TGCTTTCAAG TTCTCTGCTC CCTCCTAAA
TTCTTTCTGA TTGTCCTTCT ACGAAAGTTC AAGAGACGAG GGGAGGATTT
3151 GGTATGCATT TTTATAAGAC CATGGGACTT TTGCTGGCTT TAGATCTGAT
CGATACGTAA AAATATTCTG GTACCCTGAA AACGACCGAA ATCTAGACTA
3201 CTTTGTGAAG GAACCTTACT TCTGTGGTGT GACATAATTG GACAACTAC
GAAACACTTC CTTGGAATGA AGACACCACA CTGTATTAAC CTGTTTGATG
3251 CTACAGAGAT TTAAAGCTCT AAGGTAAATA TAAAATTTTT AAGTGTATAA
GATGTCTCTA AATTTGCGA TTCCATTTAT ATTTTAAAAA TTCACATATT
3301 TGTGTTAAAC TACTGATTCT AATTGTTTGT GTATTTTAGA TTCCAACCTA
ACACAATTTG ATGACTAAGA TTAACAAACA CATAAAATCT AAGGTTGGAT
3351 TGGAACGTGAT GAATGGGAGC AGTGGTGGAA TGCCTTTAAT GAGGAAAACC
ACCTTGACTA CTTACCCTCG TCACCACCTT ACGGAAATTA CTCCTTTTGG
3401 TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG ATGATGAGGC TACTGCTGAC
ACAAAACGAG TCTTCTTTAC GGTAGATCAC TACTACTCCG ATGACGACTG
3451 TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAAG AGAAAGGTAG AAGACCCCAA
AGAGTTTCTA GTAGAGGAGG TTTTCTTCTC TCTTCCATC TTCTGGGGTT
3501 GGACTTTTCTT TCAGAATTGC TAAGTTTTTT GAGTCATGCT GTGTTTAGTA
CCTGAAAGGA AGTCTTAACG ATTCAAAAAA CTCAGTACGA CACAAATCAT
3551 ATAGAACTCT TGCTTGCTTT GCTATTTACA CCACAAAGGA AAAAGCTGCA
TATCTTGAGA ACGAACGAAA CGATAAATGT GGTGTTTCCT TTTTCGACGT
3601 CTGCTATACA AGAAAATTAT GGAATAATAT TCTGTAACCT TTATAAGTAG
GACGATATGT TCTTTTAATA CCTTTTATA AGACATTGGA AATATTCATC
3651 GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT TTTTCTTACT CCACACAGGC
CGTATTGTCA ATATTAGTAT TGTATGACAA AAAAGAATGA GGTGTGTCCG
3701 ATAGAGTGTC TGCTATTAAT AACTATGCTC AAAAATTGTG TACCTTTAGC
TATCTCACAG ACGATAATTA TTGATACGAG TTTTAAACAC ATGGAAATCG
3751 TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA TATTTGATGT ATAGTGCCTT
AAAAATTAAA CATTTCCCCA ATTATTCCTT ATAACTACA TATCACGGAA
3801 GACTAGAGAT CGATCATAAT CAGCCATACC ACATTTGTAG AGGTTTTACT
CTGATCTCTA GCTAGTATTA GTCGGTATGG TGTAAACATC TCCAAAATGA
3851 TGCTTTAAAA AACCTCCCAC ACCTCCCCCT GAACCTGAAA CATAAAATGA
ACGAAATTTT TTGGAGGGTG TGGAGGGGGA CTTGGACTTT GTATTTTACT
3901 ATGCAATTGT TGTTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA
TACGTTAACA ACAACAATTG AACAAATAAC GTCGAATATT ACCAATGTTT

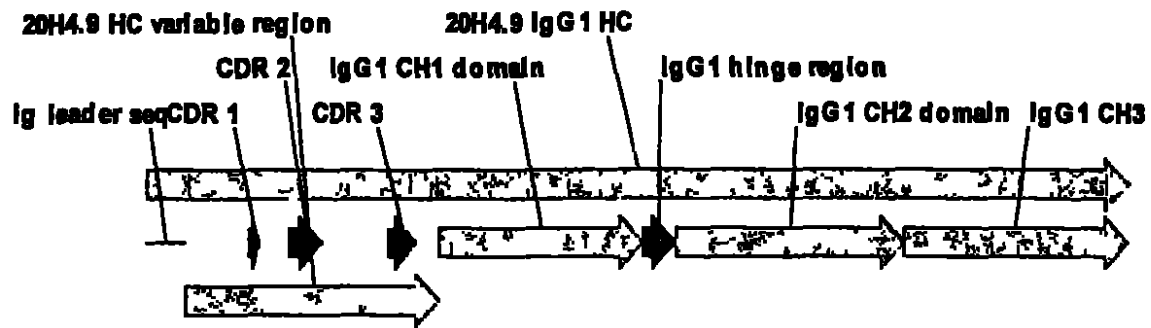
FIG 4D

3951 TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCACTGCA
ATTTTCGTTAT CGTAGTGTTT AAAGTGTTTA TTTCGTAAAA AAAGTGACGT
4001 TTCTAGTTGT GGTTTGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA
AAGATCAACA CCAAACAGGT TTGAGTAGTT ACATAGAATA GTACAGACCT
4051 TCGGCTGGAT GATCCTCCAG CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC
AGCCGACCTA CTAGGAGGTC GCGCCCTAG AGTACGACCT CAAGAAGCGG
4101 CACCCCAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTACAAAT AAAGCAATAG
GTGGGGTTGA ACAAATAACG TCGAATATTA CCAATGTTTA TTTCGTTATC
4151 CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG
GTAGTGTTTA AAGTGTTTAT TTTCGTAAAA AAGTGACGTA AGATCAACAC
4201 GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGTAT ACCGTCGACC
CAACACAGGT TGAGTAGTTA CATAGAATAG TACAGACATA TGGCAGCTGG
4251 TCTAGCTAGA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA
AGACTCGATCT CGAACCAGT TAGTACCAGT ATCGACAAAG GACACACTTT
4301 TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT
AACAAATAGGC GAGTGTTAAG GTGTGTTGTA TGCTCGGCCT TCGTATTTCA
4351 GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG
CATTTTCGGAC CCCACGGATT ACTCACTCGA TTGAGTGTA TTAACGCAAC
4401 CGCTCACTGC CGCTTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTCTGTGC AGCTGCATTA
GCGAGTGACG GCGGAAAGGT CAGCCCTTTG GACAGCACGG TCGACGTAAT
4451 ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT
TACTTAGCCG GTTGGCGGCC CCTCTCGGCC AAACGCATAA CCCGCGAGAA
4501 CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTGCTTCG GCTGCGGCGA
GGCGAAGGAG CGAGTGACTG AGCGACGCGA GCCAGCAAGC CGACGCCGCT
4551 GCGGTATCAG CTCACTCAA GCGCGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG
CGCCATAGTC GAGTGAGTTT CCGCATTAT GCCAATAGGT GTCTTAGTCC
4601 GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA
CCTATTGCGT CCTTCTTGT AACTCTGTTT TCCGGTGGT TTCCGGTCCCT
4651 ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCT
TGGCATTTTT CCGGCGCAAC GACCGCAAAA AGGTATCCGA GCGGGGGGA
4701 GACGAGCATG ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC
CTGCTCGTAG GTTTTTAGC TGCGAGTTCA GTCTCCACCG CTTTGGGCTG
4751 AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT
TCCTGATATT TCTATGGTCC GCAAAGGGGG ACCTTCGAGG GAGCACGCGA
4801 CTCCTGTTCC GACCCTGCCG CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT
GAGGACAAGG CTGGGACGGC GAATGGCCTA TGGACAGGCG GAAAGAGGGA
4851 TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC
AGCCCTTCGC ACCGCGAAG AGTATCGAGT GCGACATCCA TAGAGTCAAG
4901 GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCGTTT
CCACATCCAG CAAGCGAGGT TCGACCCGAC ACACGTGCTT GGGGGGCAAG
4951 AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG
TCGGGCTGGC GACGCGGAAT AGGCCATTGA TAGCAGAACT CAGGTTGGGC
5001 GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG
CATTCGTGTC TGAATAGCGG TGACCGTCGT CGGTGACCAT GTCCCTAATC
5051 CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA
GTCTCGCTCC ATACATCCGC CAQCATGTCT CAAGAACTTC ACCACCGGAT
5101 ACTACGGCTA CACTAGAAGG AACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA
TGATGCCGAT GTGATCTTCC TTGTCATAAA CCATAGACGC GAGACGACTT
5151 GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAA
CGGTCAATGG AAGCCTTTTT CTCGAACATC GAGAACTAGG CCGTTTGTTC
5201 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACGCGC
GGTGGCGACC ATCGCCACCA AAAAAACAAA CGTTCGTCTGT CTAATGCGCG
5251 AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CCGGGTCTGA
TCTTTTTTTC CTAGAGTTCT TCTAGGAAAC TAGAAAAGAT GCCCCAGACT

FIG 4E

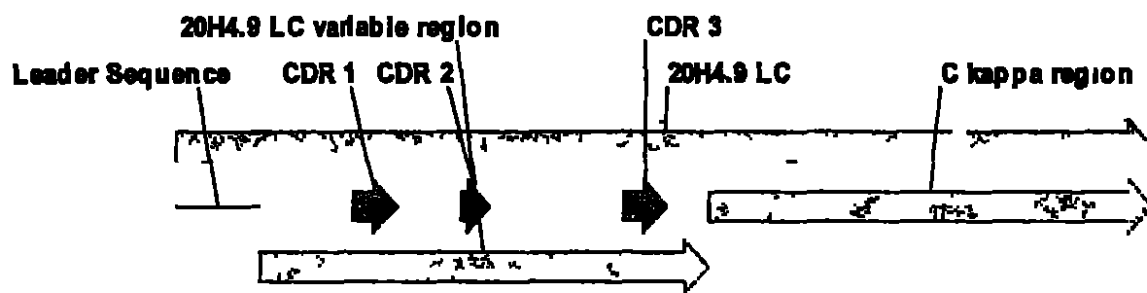
5301 CGCTCAGTGG AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT
GCGAGTCACC TTGCTTTTGA GTGCAATTCC CTAAAACCAG TACTCTAATA
5351 CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTAAAA
GTTTTTCCTA GAAGTGGATC TAGGAAAATT TAATTTTAC TTCAAAATTT
5401 TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT
AGTTAGATTT CATATATACT CATTTGAACC AGACTGTCAA TGGTTACGAA
5451 AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTTCTG TCATCCATAG
TTAGTCACTC CGTGGATAGA GTCGCTAGAC AGATAAAGCA AGTAGGTATC
5501 TTGCCTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA
AACGGACTGA GGGGCAGCAC ATCTATTGAT GCTATGCCCT CCCGAATGGT
5551 TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC
AGACCGGGGT CACGACGTTA CTATGGCGCT CTGGGTGCGA GTGGCCGAGG
5601 AGATTATCA GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG
TCTAAATAGT CGTTAFTTGG TCGGTGCGCC TTCCCGGCTC GCGTCTTCAC
5651 GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA
CAGGACGTTG AAATAGGCGG AGGTAGGTCA GATAATTAAC AACGGCCCTT
5701 GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT
CGATCTCATT CATCAAGCGG TCAATTATCA AACGCGTTGC AACACGGTA
5751 TGTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA
ACGATGTCCG TAGCACCACA GTGCGAGCAG CAAACCATAC CGAAGTAAGT
5801 GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC
CGAGGCCAAG GGTTGCTAGT TCCGCTCAAT GTACTAGGGG GTACAACACG
5851 AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCTCCG ATCCTTGTCA GAAGTAAGTT
TTTTTTCGCC AATCGAGGAA GCCAGGAGGC TAGCAACAGT CTTCAATCAA
5901 GGCCGCAGTG TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA
CCGGCGTCAC AATAGTGAGT ACCAATACCG TCGTGACGTA TTAAGAGAAT
5951 CTGTCA TGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC
GACAGTACGG TAGGCATTCT ACGAAAAGAC ACTGACCACT CATGAGTTGG
6001 AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC
TTCAGTAAGA CTCTTATCAC ATACGCCGCT GGCTCAACGA GAACGGGCGC
6051 GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA
CAGTTATGCC CTATTATGGC GCGGTGTATC GTCTTGAAAT TTTCACGAGT
6101 TCATTGGAAA ACGTTCCTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG
AGTAACCTTT TGCAAGAAGC CCCGCTTTTG AGAGTTCCTA GAATGGCGAC
6151 TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACF GATCTTCAGC
AACTCTAGGT CAAGCTACAT TGGGTGAGCA CGTGGGTGTA CTAGAAGTCG
6201 ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA
TAGAAAATGA AAGTGGTCGC AAAGACCCAC TCGTTTTTGT CCTTCCGTTT
6251 ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA
TACGGCGTTT TTTCCCTTAT TCCCGCTGTG CCTTTACAAC TTATGAGTAT
6301 CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT
GAGAAGGAAA AAGTTATAAT AACTTCGTAA ATAGTCCCAA TAACAGAGTA
6351 GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT
CTCGCCTATG TATAAATCTT CATAAATCTT TTTATTTGTT TATCCCCAAG
6401 CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTC
GCGCGTGTA AGGGGCTTTT CACGGTGGAC TGCAG

FIG 4F



20H4 9-IgG1 Heavy Chain

FIG 5



20H4 9 Light chain

FIG 6

41 28

natural Ig leader peptide

1 M K H L W F F L L L V A A P R W V
ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT
TACTTTGTGG ACACCAAGAA GGAGGAGGAC CACCGTCGAG GGTCTACCCA

20H4 9 HC variable region

51 L S Q V Q L Q Q W G A G L L K P S
CCTGTCCAG GTGCAACTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT
GGACAGGGTC CACGTTGATG TCGTCACCCC GCGTCTGAC AACTTCGGAA
CDR 1

20H4 9 HC variable region

101 E T L S L T C A V Y G G S F S G
CGGAGACCCT GTCCCTCACC TCGCTGTCT ATGGTGGGTC CTTCACTGGT
GCCTCTGGGA CAGGGAGTGG ACGCGACAGA TACCACCCAG GAAGTCACCA
CDR 1

20H4 9 HC variable region

151 Y Y W S W I R Q S P E K G L E W I
TACTACTGGA GCTGGATACG CCAGTCCCCA GAGAAGGGGC TGGAGTGGAT
ATGATGACCT CGACCTATGC GGTGAGGGGT CTCCTCCCCG ACCTCACCTA
CDR 2

20H4 9 HC variable region

201 G E I N H G G Y V T Y N P S L E S
TGGGGAAATC AATCATGGTG GATACGTCAC CTACAATCCG TCCCTCGAGA
ACCCCTTTAG TTAGTACCAC CTATGCAGTG GATGTTAGGC AGGGAGCTCT
CDR 2
--

20H4 9 HC variable region

251 R V T I S V D T S K N Q F S L K
GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCTGAAG
CAGCTCAGTG GTATAGTCAT CTGTGCAGGT TCTTGGTCAA GAGGGACTTC
CDR 3

20H4 9 HC variable region

301 L S S V T A A D T A V Y Y C A R D
CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTATATTACT GTGCGAGGGA
GACTCGAGAC ACTGGCGGCG CCTGTGCCGA CATATAATGA CACGCTCCCT
CDR 3

20H4 9 HC variable region

351 Y G P G N Y D W Y F D L W G R G T
CTATGGTCCG GGGAAATTATG ACTGGTACTT CGATCTCTGG GGCCGTGGCA
GATACCAGGC CCCTTAATAC TGACCATGAA GCTAGAGACC CCGGCACCGT

FIG 7A

IgG1 CH1 domain

20H4 9 HC variable region

401 L V T V S S A S T K G P S V F P
CCCTGGTCAC TGTCTCCTCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC
GGGACCAGTG ACAGAGGAGT CGGAGGTGGT TCCCGGGTAG CCAGAAGGGG
IgG1 CH1 domain

451 L A P S S K S T S G G T A A L G C
CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG
GACCGTGGGA GGAGGTTCTC GTGGAGACCC CCGTGTCGCC GGGACCCGAC
IgG1 CH1 domain

501 L V K D Y F P E P V T V S W N S G
CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCAGT GACGGTGTG TGGAACTCAG
GGACCAGTTC CTGATGAAGG GGCTTGGCCA CTGCCACAGC ACCTTGAGTC
IgG1 CH1 domain

551 A L T S G V H T F P A V L Q S S
GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA
CGCGGGACTG GTCGCCGCAC GTGTGGAAGG GCCGACAGGA TGTCAGGAGT
IgG1 CH1 domain

601 G L Y S L S S V V T V P S S S L G
GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
CCTGAGATGA GGGAGTCGTC GCACCACTGG CACGGGAGGT CGTCGAACCC
IgG1 CH1 domain

651 T Q T Y I C N V N H K P S N T K V
CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
GTGGGTCTGG ATGTAGACGT TGACTTAGT GTTCGGGTCG TTGTGGTTCC
IgG1 CH1 domain

IgG1 hinge region

701 D K R V E P K S C D K T H T C P
TGGACAAGAG AGTTGAGCCC AAATCTTGTG ACAAACTCA CACATGCCCA
ACCTGTTCTC TCAACTCGGG TTTAGAACAC TGTTTTGAGT GTGTACGGGT
IgG1 CH2 domain

IgG1 hinge region

751 P C P A P E L L G G P S V F L F P
CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG
IgG1 CH2 domain

801 P K P K D T L M I S R T P E V T C
CCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA

FIG 7B

IgG1 CH2 domain

V V V D V S H E D P E V K F N W
851 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
CGCACCACTCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG GACTCCAGTT CAAGTTGACC
IgG1 CH2 domain

Y V D G V E V H N A K T K P R E E
901 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT
IgG1 CH2 domain

Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q
951 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCCTGCACC
CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAAGT GCAGGAGTGG CAGGACGTGG
IgG1 CH2 domain

D W L N G K E Y K C K V S N K A
1001 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA CGTTCCAGAG GTTGTTCGG
IgG1 CH3 domain

IgG1 CH2 domain

L P A P I E K T I S K A K G Q P R
1051 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC
IgG1 CH3 domain

E P Q V Y T L P P S R D E L T K N
1101 AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG GGCCCTACTC GACTGGTTCT
IgG1 CH3 domain

Q V S L T C L V K G F Y P S D I
1151 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
TGGTCCAGTC GGA CTGGACG GACCAGTTTC CGAAGATAGG GTCGCTGTAG
IgG1 CH3 domain

A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
1201 GCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC
CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC CTCTTGTGA TGTCTGGTG
IgG1 CH3 domain

P P V L D S D G S F F L Y S K L T
1251 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAC AGCAAGCTCA
CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA GAAGGAGATG TCGTTCGAGT
IgG1 CH3 domain

V D K S R W Q Q G N V F S C S V
1301 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCOCT TGCAGAAGAG TACGAGGCAC

FIG 7C

44 ~~75~~

```

                                IgG1 CH3 domain
                                ~~~~~
      M H E A L H N H Y T Q K S L S L S
1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
      TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC GTCTTCTCGG AGAGGGACAG
      IgG1 CH3 domain
      ~~~~~
      P G K
1401 CCCGGGTAAA TGA
      GGGCCCATTT ACT

```

FIG 7D

45^{3/6}

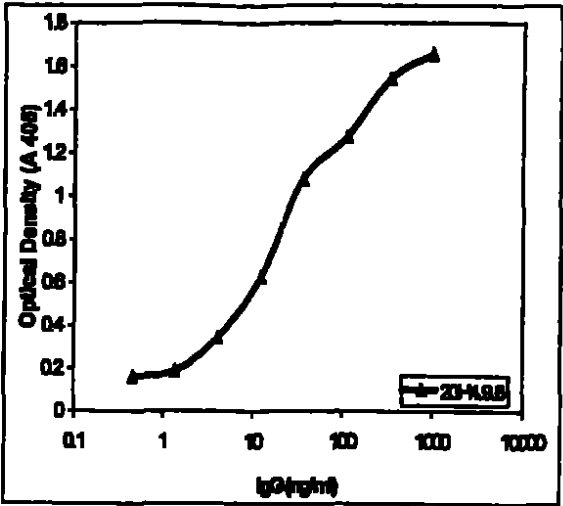


FIG 8A

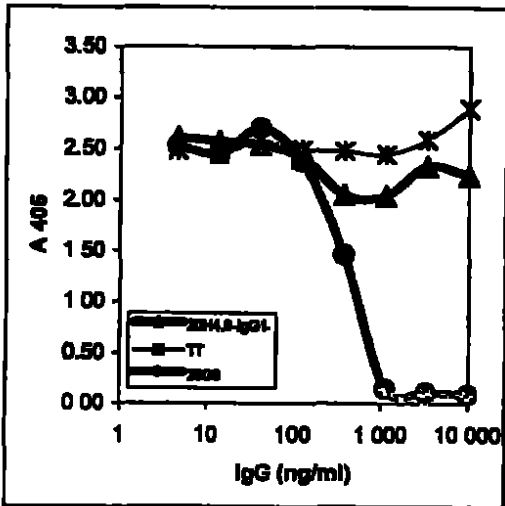


FIG 8B

46 74

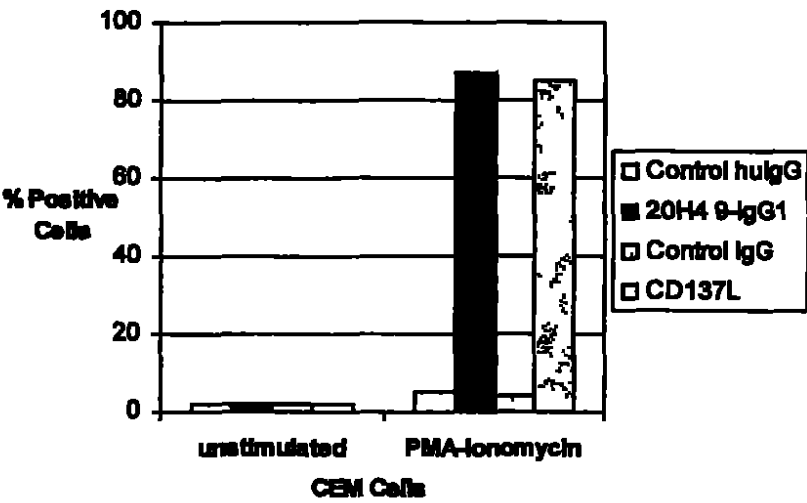


FIG 9A

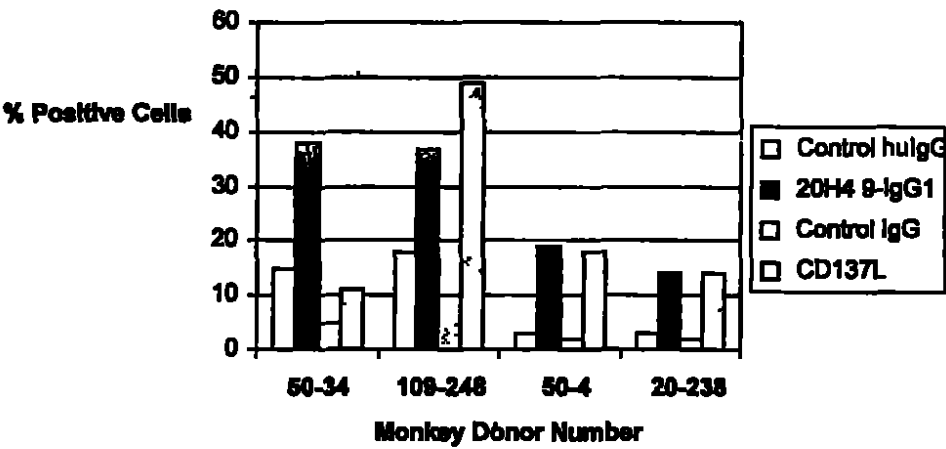
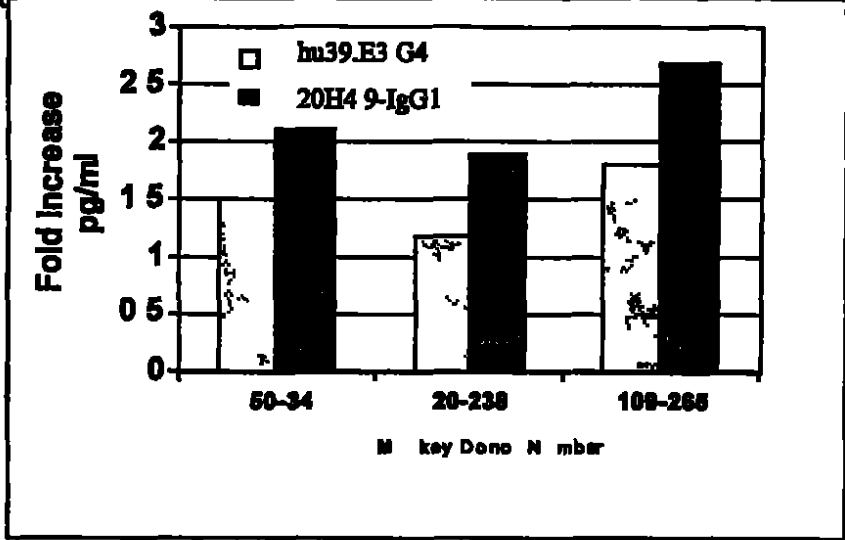
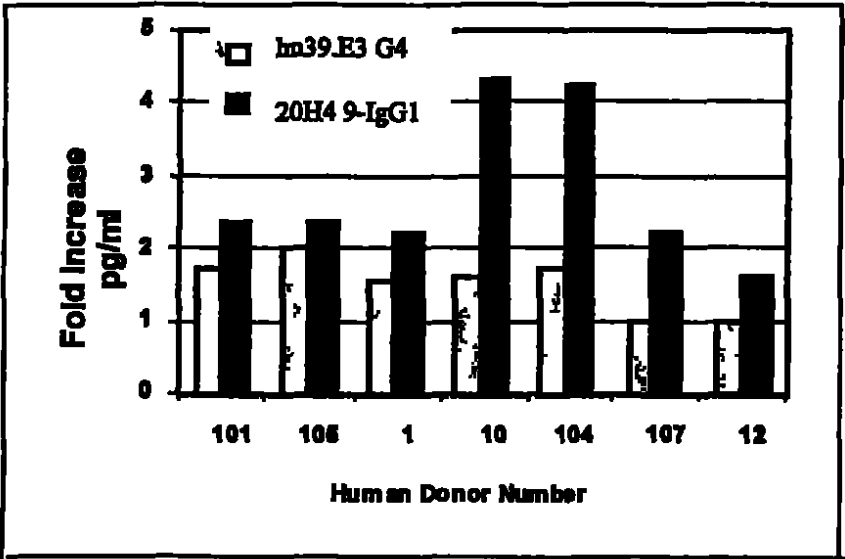


FIG 9B

47
48



48

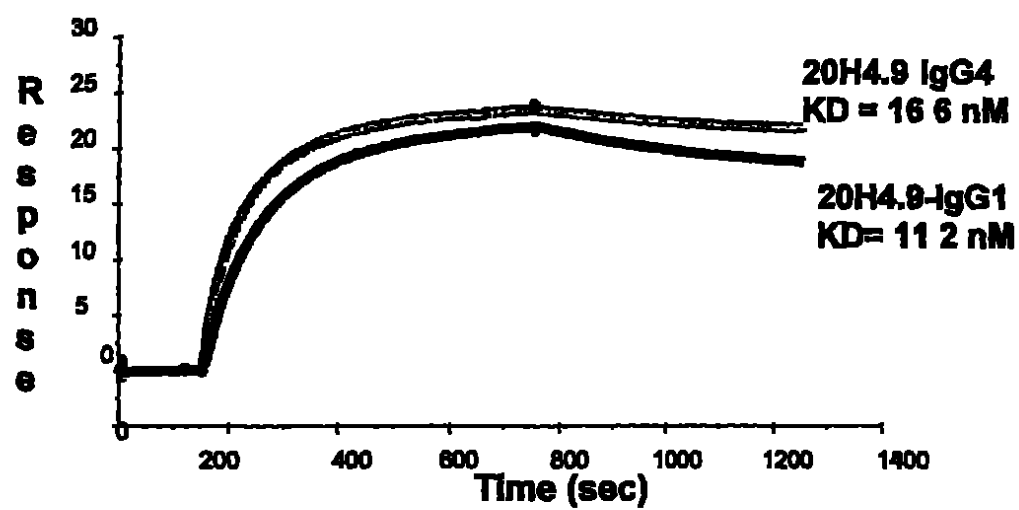


FIG 11

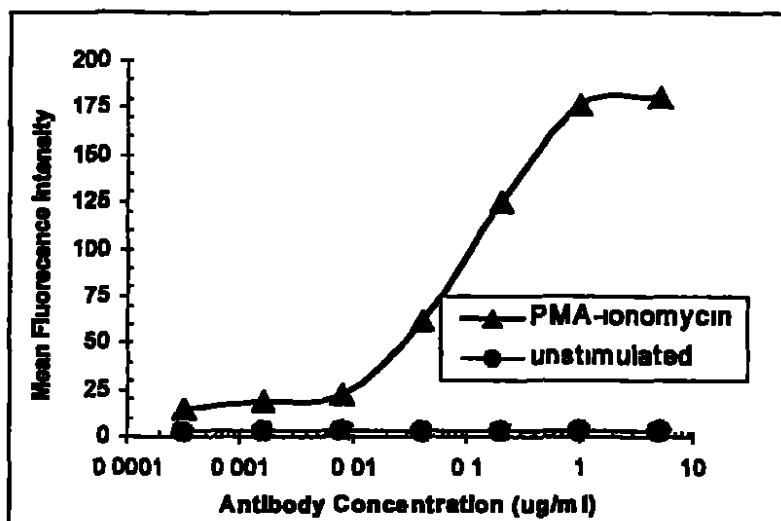


FIG 12

50 51

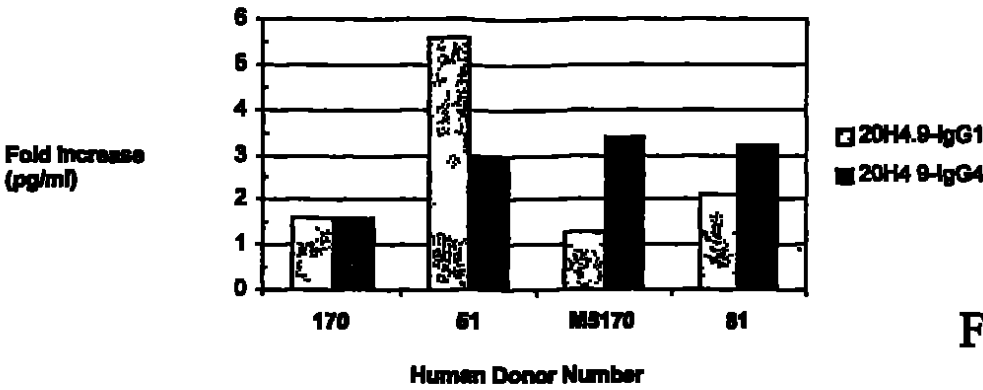


FIG 13A

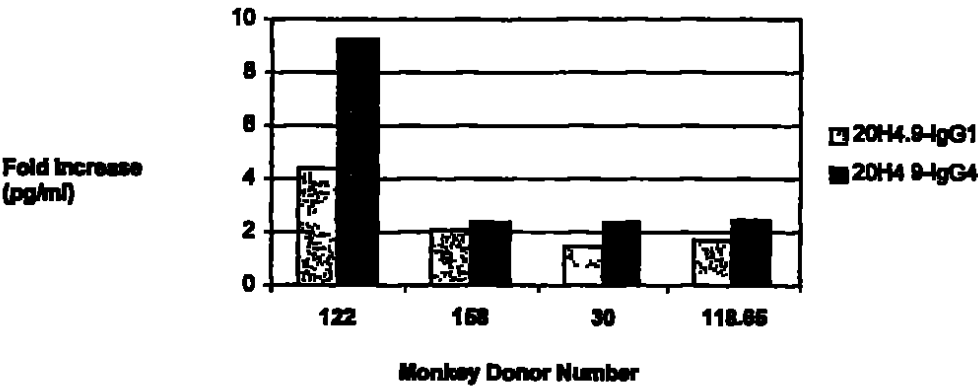


FIG 13B

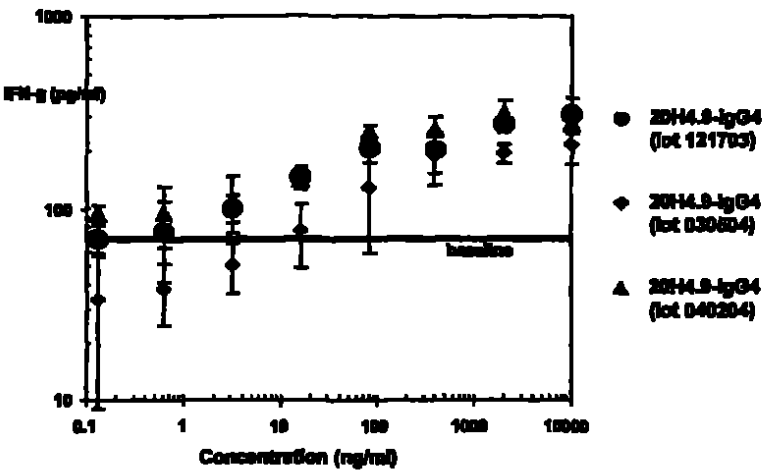


FIG 14A

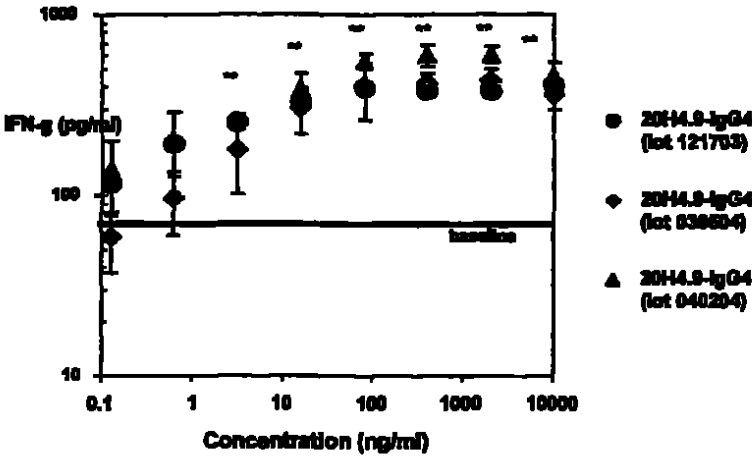


FIG 14B

52

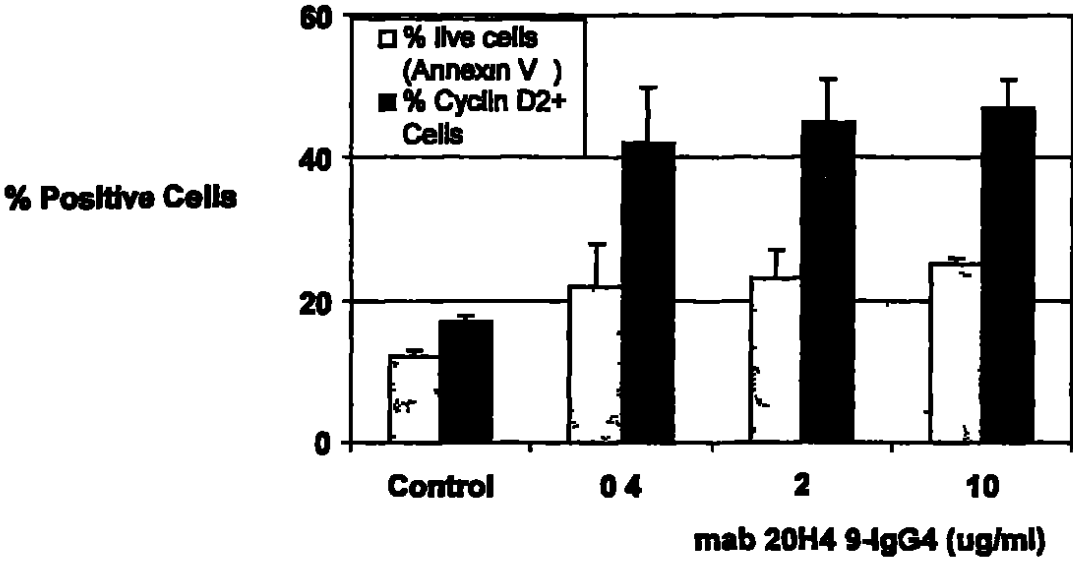


FIG 15

53

FIG 16A

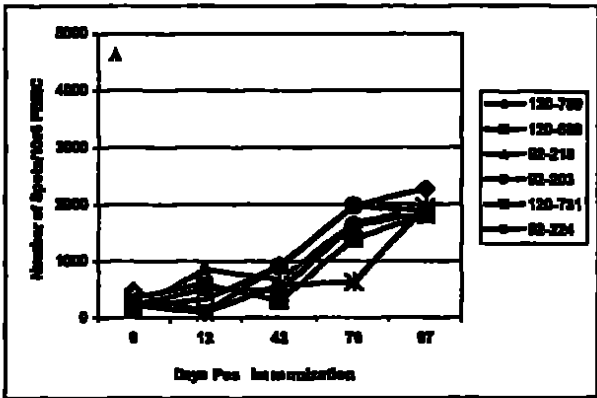


FIG 16B

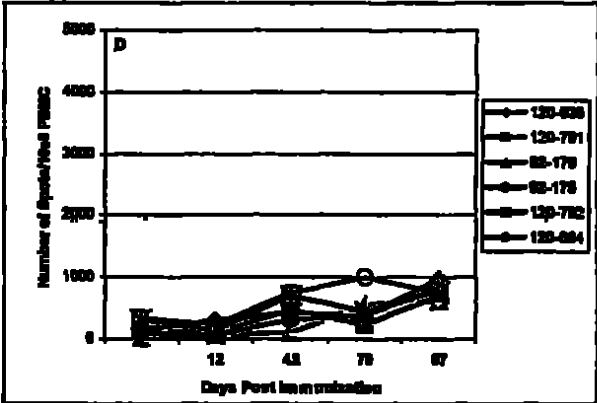
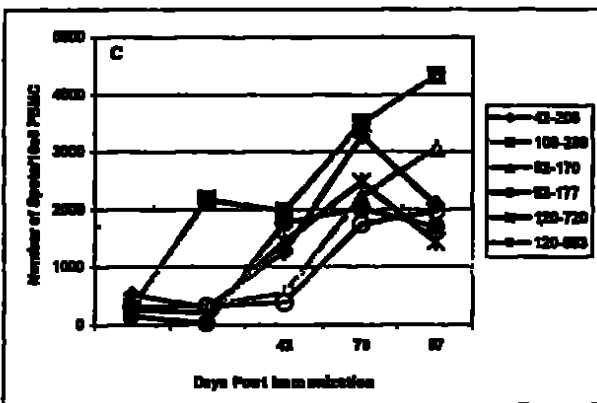
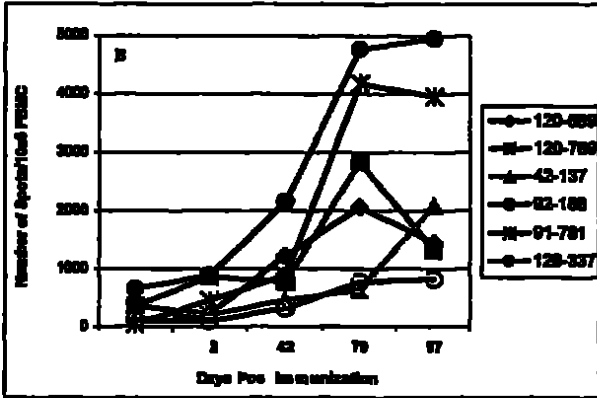


FIG 16C

FIG 16D

54 55

SEQUENCE LISTING

<110> Jure-Kunkel Maria
Hefta Laura
Santoro Marc
Ganguly Subinay

<120> FULLY HUMAN ANTIBODIES AGAINST HUMAN 4-1BB

<130> 10060 PCT

<150> US 60/510193

<151> 2003-10-10

<150> not yet assigned

<151> 2004-10-08

<160> 9

<170> PatentIn version 3 2

<210> 1

<211> 7057

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificial sequence

<400> 1

```

cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc      60
aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt      120
aatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta      180
tgttcccata gtacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg actatttacg      240
gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga      300
cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt      360
tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg      420
gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttcaa gtctccaccc      480
cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaatcaa cgggactttc caaatgtcg      540
taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat      600
aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg aaattaatac      660
gactcactat agggagaccc aagcttggt cgcgatgaa acacctgtgg ttcttctoc      720
tcctggtggc agtcccaga tgggtcctgt ccaggtgca actacagcag tggggcgag      780
gactgttgaa gccttcggag accctgtccc tcacctgcgc tgtctatggt gggtocttca      840
gtggttacta ctggagctgg atacgccagt cccagagaa ggggctggag tggattgggg      900

```

aaatcaatca tggtagatcac gtcacctaca atccgtccct cgagagtoga gtcaccatat 960
 cagtagacac gtccaagaac cagttctccc tgaagctgag ctctgtgacc gccggggaca 1020
 cggctgtata ttactgtgag agggactatg gtccggggaa ttatgactgg tacttcgac 1080
 tctggggccg tggcaccctg gtcactgtct cctcagctag caccaagggc ccatccgtct 1140
 tccccctggc gccctgctcc agggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg 1200
 tcaaggacta cttccccgaa ccgggtgacg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg 1260
 gctgtcacac cttccccggt gtcttacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg 1320
 tgaccgtgcc ctccagcagc ttggggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc 1380
 ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agtccaaata tggtcacact tgcccacctt 1440
 gccagcacc tgagttcctg gggggaccat cagtcttcct gttcccccca aaaccaagg 1500
 acactctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtaggac gtgagccagg 1560
 aagaccccg ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga 1620
 caaagccgag ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc 1680
 tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgaac ggtctccaac aaaggcctcc 1740
 cgtctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gcccagagag ccacaggtgt 1800
 acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg 1860
 tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga 1920
 acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca 1980
 ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc 2040
 atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtaatgat 2100
 ctagagggcc ctattctata gtgtcaccta aatgctagag ctgctgatc agcctcgact 2160
 gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc cgtgccttc cttgacctg 2220
 gaaggtgcca ctoccatgt cttttcctaa taaatgagg aaattgcac gcattgtctg 2280
 agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg 2340
 gaagacaata gcaggcatgc tggggatgag gtgggctcta tggcttctga ggcggaaaga 2400
 accagctggg gctctagggg gtatccccac gcgccctgta gcggcgcat aagcgggcg 2460
 ggtgtggtgg ttacggcag cgtgacgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctct 2520
 ttcgctttct tcccttctt tctcgccagc ttccggggc ctctcaaaaa agggaaaaaa 2580
 agcatgcac tcaattagtc agcaaccata gtccggcccc taactcgcc catccgccc 2640

ctaactcogc ccagttccgc ccattctcgc ccccatggct gactaatttt tttatttat 2700
 gcagaggccg aggcgcctc ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt 2760
 ggaggcctag gcttttgcaa aaagcttgga cagctcaggg ctgcgatttc gcgccaaact 2820
 tgacggcaat cctagcgtga aggctggtag gattttatcc ccgctgccat catggttcga 2880
 ccattgaact gcctcgtcgc cgtgtcccaa aatatgggga ttggcaagaa cggagacctt 2940
 ccctggcctc cgctcaggaa cgagttcaag tacttccaaa gaatgaccac aacctcttca 3000
 gtggaaggta aacagaatct ggtgattatg ggtaggaana cctggttctc cattcctgag 3060
 aagaatcgac ctttaagga cagaattaat atagttctca gtagagaact caaagaacca 3120
 ccacgaggag ctcatTTTTt tgccaaaagt ttggatgatg ccttaagact tattgaacaa 3180
 ccggaattgg caagtaaagt agacatggtt tggatagtcg gaggcagttc tgtttaccag 3240
 gaagccatga atcaaccagg ccaccttaga ctctttgtga caaggatcat gcaggaattt 3300
 gaaagtgaca cgtttttccc agaaattgat ttggggaaat ataaacttct cccagatatac 3360
 ccaggcgtcc tctctgaggt ccaggaggaa aaaggcatca agtataagtt tgaagtctac 3420
 gagaagaaag actaacagga agatgctttc aagttctctg ctccctcctt aaagctatgc 3480
 atttttataa gaccatggga cttttgctgg ctttagatct ctttgtgaag gaaccttact 3540
 tctgtggtgt gacataattg gacaaactac ctacagagat ttaaagctct aaggtaaata 3600
 taaaattttt aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttgt gtattttaga 3660
 ttccaacctt tggaactgat gaatgggagc agtgggtgaa tgcctttaat gaggaanaacc 3720
 tgttttgctc agaagaaatg ccatctagtg atgatgaggc tactgctgac tctcaacatt 3780
 ctactcctcc aaagaagaag agaaaggtag aagaccccaa ggactttcct tcagaattgc 3840
 taagtTTTTt gagtcatgct gtgttttagta atagaactct tgcttgcttt gctattttaca 3900
 ccacaaagga aaagctgca ctgctataca agaaaattat ggaaaaatat tctgtaacct 3960
 ttataagtag gcataacagt tataatcata acatactgtt ttttcttact ccacacaggc 4020
 atagagtgtc tgctattaat aactatgctc aaaaattgtg tacottttagc tttttaattt 4080
 gtaaaagggg taataaggaa tatttgatgt atagtgcctt gactagagat cataatcagc 4140
 cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac 4200
 ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gttacttgtt ttattgcagc ttataatggt 4260
 tacaaataaa gcaatagcat ccaaaatttc acaataaag ctttttttct actgcattct 4320
 agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggatcgg ctggatgatc 4380
 ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttgcccacc ccaacttgtt tattgcagct 4440

tataatgggtt	acaaataaag	caatagcatc	acaaatttca	caaataaagc	atTTTTTTca	4500
ctgcattcta	gttgtgggtt	gtccaaactc	atcaatgtat	cttatcatgt	ctgtataccg	4560
tcgacctcta	gctagagctt	ggcgtaatca	tggtcatagc	tgtttcctgt	gtgaaattgt	4620
tatccgctca	caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctgggggt	4680
gcctaattgag	tgagctaaact	cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	tttccagtcg	4740
ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	atcgccaac	gcggggggag	aggcggtttg	4800
cgtattgggc	gctcttccgc	ttcctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggt	cgttcggctg	4860
cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	4920
aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	4980
gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcaca	aatcgacgc	5040
tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgacagga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	5100
agctccctcg	tgcgctctcc	tgttcgacc	ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	5160
ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcaa	tgctcacgct	gtaggtatct	cagttcgggtg	5220
taggtcgttc	gtccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	cgttcagcc	cgaccgctgc	5280
gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtc	aaccgggtaa	gacacgactt	atcgccactg	5340
gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggatg	taggcgggtg	tacagagttc	5400
ttgaagtgg	ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	5460
ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaagaggtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	5520
gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagtcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	5580
caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaaacga	aaactcacgt	5640
taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	5700
aatgaagt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttgggtctga	cagttaccaa	5760
tgcttaata	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcac	catagttgcc	5820
tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggaggggt	taccatctgg	cccagtgct	5880
gcaatgatac	cgcgagacco	acgctcacgg	gctccagatt	tateagcaat	aaaccagcca	5940
gccggaaggg	cgagcgcgag	aagtggtcct	gcaactttat	ccgcctccat	ccagtctatt	6000
aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	atagtttgcg	caacgttggt	6060
gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	gtatggcttc	attcagctcc	6120
ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tcccccatgt	tgtgcaaaaa	agcgggttagc	6180

tccttcgggc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttata actcatgggt 6240
 atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 6300
 ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 6360
 ccggcgctcaa tacgggataa taccgogcca catagcagaa ctttanaagt gctcatcatt 6420
 ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 6480
 atgtaaccca ctogtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 6540
 ggggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 6600
 tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 6660
 ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttcgcgc 6720
 acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc gacggatcgg gagatctgct aggtgacctg 6780
 aggcgcgcgc gcttcgaata gccagagtaa cctttttttt taattttatt ttattttatt 6840
 tttgagatgg agtttggcgc cgatctcccg atccctatg gtcgactctc agtacaatct 6900
 gctctgatgc cgcatagtta agccagtatc tgctccctgc ttgtgtgttg gaggtcgtg 6960
 agtagtgccg gagcaaaatt taagctacaa caaggcaagg cttgaccgac aattgcatga 7020
 agaactctgct tagggttagg cgttttgccg tgcttcg 7057

<210> 2
 <211> 7057
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificial sequence

<400> 2
 gctacatgcc cggctatat gcgcaactgt aactaataac tgatcaataa ttatcattag 60
 ttaatgcccc agtaatcaag tatcgggtat atacctcaag gcgcaatgta ttgaatgcca 120
 tttaccgggc ggaccgactg gcgggttgct gggggcgggt aactgcagtt attactgcat 180
 acaagggtat cattgcggtt atccctgaaa ggtaactgca gttaccacc tgataaatgc 240
 catttgacgg gtgaaccgtc atgtagttca catagtatac ggttcattgc ggggataact 300
 gcagttactg ccatctaccg ggcggaacct aatacgggtc atgtactgga ataccctgaa 360
 aggatgaacc gtcatgtaga tgcataatca gtagcgataa tggtaacct acgcaaac 420
 cgtcatgtag ttaccgcac ctatcgccaa actgagtgcc cctaaagggt cagaggtggg 480
 gtaactgcag ttaccctcaa acaanaccgt ggtttttagtt gccctgaaag gttttacago 540
 attgttgagg cggggtaact gcgtttacc gccatccgca catgccacc tccagatata 600

```

ttcgtctcga gagaccgatt gatctcttgg gtgacgaatg accgaatagc ttttaattatg 660
ctgagtgata tccctctggg ttcgaaccat ggcggtactt tgtggacacc aagaaggagg 720
aggaccaccg tcgaggggtct acccaggaca ggggtccacgt tgatgtcgtc accccgcgtc 780
ctgacaactt cggaagcctc tgggacaggg agtggacgcg acagatacca cccaggaagt 840
caccaatgat gacctcgacc tatgcggtca ggggtctctt ccccgacctc acctaacccc 900
tttagttagt accacctatg cagtggatgt taggcagggg gctctcagct cagtgggtata 960
gtcatctgtg caggttcttg gtcaagaggg acttcgactc gagacactgg oggcgcctgt 1020
gccgacatat aatgacacgc tccctgatac caggcccctt aatactgacc atgaagctag 1080
agaccccggc accgtgggac cagtgcaga ggagtcgatc gtggttcccg ggtaggcaga 1140
agggggaccg cgggacgagg tcctcgtgga ggctctcgtg tcggcgggac ccgacggacc 1200
agttcctgat gaaggggctt ggcactgcc acagcacctt gagtccgcgg gactggtcgc 1260
cgcacgtgtg gaagggccga caggatgtca ggagtcctga gatgaggag tcgtgcacc 1320
actggcacgg gaggtcgtcg aaccctgtct tctggatgtg gacgttgcat ctagtgttcg 1380
ggtcgttgtg gttccacctg ttctctcaac tcaggtttat accagggtga acgggtggaa 1440
cgggtcgtgg actcaaggac cccctggta gtcagaagga caaggggggt tttgggttcc 1500
tgtgagagta ctagagggcc tggggactcc agtgcacgca ccaccacctg cactcgttcc 1560
ttctggggct ccagggtcaag ttgacctgc acctaccgca cctccacgta ttacggttct 1620
gtttcggcgc cctcctcgtc aagttgtcgt gcatggcaca ccagtcgcag gagtggcagg 1680
acgtggtcct gaccgacttg ccgttcctca tgttcacgtt ccagaggttg tttccggagg 1740
gcaggaggtg gctcttttgg tagaggtttc ggtttcccgt cggggctctc ggtgtccaca 1800
tgtgggacgg gggtagggtc ctctctact ggttcttggc ccagtcggac tggacggacc 1860
agtttccgaa gatggggctg ctgtagcggc acctaccct ctcgttaccc gtcggcctct 1920
tgttgatgtt ctggtgcgga gggcacgacc tgaggctgcc gaggaagaag gagatgtcgt 1980
ccgattggca cctgttctcg tccacctcc tccccttaca gaagagtacg aggcactacg 2040
tactccgaga cgtgttgggt atgtgtgtct tctcggagag ggacagagac ccatttacta 2100
gatctcccgg gataagatat cacagtggat ttacgatctc gagcgactag tcggagctga 2160
cacggaagat caacggtcgg tagacaacaa acggggaggg ggcacggaag gaactgggac 2220
cttccacggc gagggtgaca ggaaggatt attttactcc tttaacgtag cgtaacagac 2280
tcctccacag taagataaga cccccaccc caccctgtcc tgtcgttccc cctcctaacc 2340

```

```

cttctgttat cgtccgtacg acccctacgc caccogagat accgaagact ccgcctttct 2400
tggtcgaccc cgagatcccc cataggggtg cgcgggacat cgccgcgtaa ttcgcgcgcg 2460
ccacaccacc aatgcgcgtc gcactggcga tgtgaacggt cgcgggatcg cgggcgagga 2520
aagcgaaaga agggaaggaa agagcgggtc aagcggcccg gagagttttt tccctttttt 2580
tcgtacgtag agttaatcag tcgttggtat cagggcgggg attgaggcgg gtagggcggg 2640
gattgaggcg ggtcaaggcg ggtaagaggc ggggtaccga ctgattaaa aaaataaata 2700
cgtctccggc tccggcggag coggagactc gataaggctt tcatcactcc tccgaaaaaa 2760
cctccggatc cgaanaacgt tttcgaaact gtcgagtcgc gacgctaaag cgcggtttga 2820
actgccgtta ggatcgcaact tccgaccatc ctaaaatagg ggcgacggta gtaccaagct 2880
ggtaacttga cgtagcagcg gcacagggtt ttataccctt aaccgttctt gcctctggat 2940
gggaccggag gcgagtcctt gctcaagttc atgaaggttt cttactggtg ttggagaagt 3000
caccttccat ttgtcttaga ccactaatac ccataccttt ggaccaagag gtaaggactc 3060
ttcttagctg gaaatttcct gtcttaatta tatcaagagt catctcttga gtttcttggt 3120
ggtgctctc gagtaaaaga acggttttca aacctactac ggaattctga ataacttggt 3180
ggccttaacc gttcatttca tctgtaccaa acctatcagc ctccgtcaag acaaatggtc 3240
cttcggtact tagttggtcc ggtggaatct gagaacact gttcctagta cgtccttaa 3300
ctttcactgt gcaaaaaggg tctttaacta aacccttta tatttgaaga gggctctatg 3360
ggtccgcagg agagactcca ggtcctcctt tttccgtagt tcatattcaa acttcagatg 3420
ctcttctttc tgattgtcct tctacgaag ttcaagagac gaggggagga tttcgatacg 3480
taaaaatatt ctggtaccc taaaacgacc gaaatctaga gaaacacttc cttggaatga 3540
agacaccaca ctgtattaac ctgtttgatg gatgtctcta aatttcgaga ttccatttat 3600
attttaaaaa ttcacatatt acacaatttg atgactaaga ttaacaaaca cataaatct 3660
aaggttggat accttgacta cttaccctcg taccacctt acggaatta ctccttttgg 3720
acaaaacgag tcttctttac gg agatcac tactactccg atgacgactg agagttgtaa 3780
gatgaggagg ttttttcttc tctttccatc ttctggggtt cctgaaagga agtcttaacg 3840
attcaaaaaa ctcagtacga cacaatcat tatcttgaga acgaacgaaa cgataaatgt 3900
ggtgtttcct ttttcgacgt gacgatatgt tcttttaata cttttttata agacattgga 3960
aatattcatc cgtattgtca atattagtat tgtatgacaa aaaagaatga ggtgtgtccg 4020
tatctcacag acgataatta ttgatacgag tttttaacac atggaastcg aaaaattaaa 4080
catttcccca attattcctt ataaactaca tatcacgaa ctgatctcta gtattagtcg 4140

```

gtatggtgta aacatctcca aatgaacga aatTTTTTgg aggggtgtgga gggggacttg 4200
 gactttgtat ttactttacg ttaacaaaca caattgaaca aataacgtcg aatattacca 4260
 atgtttatTT cgttatcgta gtgtttaaag tgtttatTtc gtaaaaaaag tgacgtaaga 4320
 tcaacaccaa acaggtttga gtagttacat agaatagtac agacctagcc gacctactag 4380
 gaggtcgcgc ccctagagta cgacctcaag aagcgggtgg ggttgaacaa ataacgtcga 4440
 atattaccaa tgtttatTtc gttatcgtag tgtttaaagt gtttatTtog taaaaaaagt 4500
 gacgtaagat caacaccaa caggtttgag tagttacata gaatagtaca gacatatggc 4560
 agctggagat cgatctcgaa ccgcattagt accagtatcg acaaaggaca cactttaaca 4620
 ataggcgagt gtttaaggtgt gtgtatgct cggccttctg atttcacatt tcggacocca 4680
 cggattactc actcgattga gtgtaattaa cgcaacgcga gtgacgggcg aaaggtcagc 4740
 cctttggaca gcacggtcga cgtaattact tagccggttg cgcgcccctc tccgccaaac 4800
 gcataacccg cgagaaggcg aaggagcgag tgactgagcg acgcgagcca gcaagccgac 4860
 gccgctcgcc atagtcgagt gagtttccgc cattatgcca atagggtgtct tagtccccta 4920
 ttgcgtcctt tctgtacac tcgttttccg gtcgttttcc ggtccttggc atttttccgg 4980
 cgcaacgacc gcaaaaaggt atccgaggcg gggggactgc tcgtagtgtt tttagctgcg 5040
 agttcagtct ccaccgcttt gggctgtcct gatatttcta tggcccgca agggggacct 5100
 tcgagggagc acgcgagagg acaaggctgg gacggcgaat ggcctatgga caggcggaac 5160
 gaggggaagc cttcgcaccg cgaaagagtt acgagtgcga catccataga gtcaagccac 5220
 atccagcaag cgaggttoga cccgacacac gtgcttgggg ggcaagtcgg gctggcgacg 5280
 cggaataggc cattgatagc agaactcagg ttgggccatt ctgtgctgaa tagcggtgac 5340
 cgtcgtcggg gaccattgtc ctaatcgtct cgtccatac atccgccacg atgtctcaag 5400
 aacttcacca ccggattgat gccgatgtga tcttcctgtc ataaaccata gacgcgagac 5460
 gacttcggtc aatggaagcc tttttctcaa ccacgagaa ctaggccgtt tgtttggtgg 5520
 cgaccatcgc caccacaaaa acaaacgttc gtcgtcta atgcgtcttt ttttcctaga 5580
 gttcttctag gaaactagaa aagatgcccc agactgcgag tcaccttgct tttgagtcca 5640
 attocctaaa accagtactc taatagtttt tcctagaagt ggatctagga aaatttaatt 5700
 ttacttcaa aatttagtta gatttcatat atactcattt gaaccagact gtcaatggtt 5760
 acgaattagt cactccgtgg atagagtcgc tagacagata aagcaagtag gtatcaacgg 5820
 actgaggggc agcacatcta ttgatgtat gccctccga atggtagacc ggggtcacga 5880

cgttactatg gcgctctggg tgcgagtggc cgaggtctaa atagtcgtta tttggtcggg 5940
 oggocctccc ggctcgcgtc ttcaccagga cgttgaaata ggoggaggta ggtcagataa 6000
 ttaacaacgg cccttcgatc tcattcatca agcgggtcaat tatcaaacgc gttgcaacaa 6060
 cggtaacgat gtccgtagca ccacagtgcg agcagcaaac cataccgaag taagtcgagg 6120
 ccaagggttg ctagttccgc tcaatgtact aggggggtaca acacgttttt tcgccaatcg 6180
 aggaagccag gaggctagca acagtcttca ttcaaccggc gtcacaatag tgagtaccaa 6240
 taccgtcgtg acgtattaag agaatgacag tacggtaggc attctacgaa aagacactga 6300
 ccaotcatga gttgggtcag taagactctt atcacatacg ccgctggctc aacgagaacg 6360
 ggccgcagtt atgccctatt atggcgcggt gtatcgtctt gaaattttca cgagtagtaa 6420
 ccttttgcaa gaagccccgc ttttgagagt tcctagaatg gcgacaactc taggtcaagc 6480
 tacattgggt gagcacgtgg gttgactaga agtcgtagaa aatgaaagtg gtcgcaaga 6540
 cccactcgtt tttgtccttc cgttttacgg cgttttttcc cttattcccg ctgtgccttt 6600
 acaacttatg agtatgagaa ggaaaaagtt ataataactt cgtaaatagt cccaataaca 6660
 gagtactcgc ctatgtataa acttacataa atctttttat ttgtttatcc ccaaggcgcg 6720
 tgtaaagggg cttttcacgg tggactgcag ctgcctagcc ctctagacga tccactggac 6780
 tccgcgcggc cgaagcttat cggctctcatt ggaaaaaaaa attaaaataa aataaaataa 6840
 aaactctacc tcaaaccgcg gctagagggc taggggatac cagctgagag tcatgttaga 6900
 cgagactacg gcgtatcaat tcggtcatag acgagggacg aacacacaac ctccagcgac 6960
 tcatcacgcg ctcgttttta attcgatggt gtcccgttcc gaactggctg ttaacgtact 7020
 tcttagadga atccaatcc gcanaacgcg acgaagc 7057

<210> 3
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificial sequence

<400> 3

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

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30

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

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

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

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

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

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

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

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

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
275 280 285

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Gly Lys
465

<210> 4
<211> 6435
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificial sequence

<400> 4

```

gacggatcgg gagatctgct agcccgggtg acctgagggc cgcgggcttc gaatagccag      60
agtaaccttt ttttttaatt ttattttatt ttatttttga gatggagttt ggcgccgac      120
tccgatccc ctatggtcga ctctcagtac aatctgctct gatgccgat agttaagcca      180
gtatctgctc cctgcttggt tgttgagggt cgctgagtag tgcgcgagca aaatttaagc      240
tacaacaagg caaggcttga ccgacaattg catgaagaat ctgcttaggg ttaggcgttt      300
tgcgctgctt cgcgatgtac gggccagata tacgcgttga cattgattat tgactagtta      360
ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgogttac      420
ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg accgcccac gaccccgcc cattgacgtc      480
aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt      540
ggagtattta cggtaaatg ccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac      600
gccccctatt gacgtcaatg acggtaatg gcccgctgg cattatgcc agtacatgac      660
cttatgggac tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggg      720
gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc      780
aagtctccac ccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaatc aacgggactt      840
tccaaatgt cgtacaact ccgcccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg      900
ggaggtctat ataagcagag ctctctggct aactagagaa ccactgctt actggcttat      960
cgaattant acgactcact atagggagac ccaagcttat caacaagttt gtacaaaaaa     1020
gcaggctggt accatggaag cccagctca gcttctcttc ctctgctac tttggctccc     1080
agataccacc ggagaaattg tgttgacaca gtctccagcc accctgtctt tgtctccagg     1140
ggaagagacc accctctct gaggggccag tcagagtgtt agcagctact tagcctggtg     1200
ccaacagaaa cctggccagg ctcccaggt cctcatctat gatgcatcca acagggccac     1260
tggcatccca gccaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag     1320
cagcctagag cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagcgtagca actggcctcc     1380
ggcgtcact ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaa cgtacgggtg ctgcaccatc     1440
tgtcttcac ttcocgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg     1500
cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacgccot     1560
ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag     1620
cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aacacaaaag tctacgcctg     1680

```

cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcaccaag agcttcaaca ggggagagtg 1740
 ttagacccag ctttcttgta caaagtgggt gatctagagg gccctattct atagtgtcac 1800
 ctaaagtcta gagctcgctg atcagcctcg actgtgcctt ctagttagca gccatctgtt 1860
 gtttgccct ccccgctgcc ttcttgacc ctggaagggt ccactccac tgtcctttcc 1920
 taataaaatg aggaaattgc atcgcatgt ctgagtaggt gtcattctat tctgggggt 1980
 ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctgggat 2040
 gcggtgggct ctatggcttc tgaggcgga agaaccagct ggggctctag ggggtatccc 2100
 cacgcgccct gtagcggcg attaagcgcg ggggtgttg tggttagcg cagcgtgacc 2160
 gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc 2220
 acgttcgccg ggctctcaa aaaaggaaa aaaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc 2280
 atagtcgccg ccctaactcc gccatcccg ccctaactc cggccagttc ogccattct 2340
 ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctgggctct 2400
 gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctt 2460
 ggggggacag ctcagggctg cgatttcgcg ccaaacttga cggcaatcct agcgtgaagg 2520
 ctggtaggat tttatccccg ctgccatcat ggttcgacca ttgaactgca tcgtcgccgt 2580
 gtcccaaat atggggattg gcaagaacgg agacctacc tggcctccgc tcaggaacga 2640
 gttcaagtac ttcaaagaa tgaccacaac ctcttcagt gaaggtaaag agaactctgt 2700
 gattatgggt aggaaacct ggttctccat tctgagaag aatcgacctt taaggacag 2760
 aattaatata gttctcagta gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc atttcttgc 2820
 caaaagtgtg gatgatgcct taagacttat tgaacaaccg gaattggca gtaagtaga 2880
 catggtttg atagtcggag gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca 2940
 cctcagactc tttgtgaca ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt tttccaga 3000
 aattgatttg gggaaatata aacttctcc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca 3060
 ggaggaaaaa ggcataagt ataagttga agtctacgag aagaagact aacaggaaga 3120
 tgctttcaag ttctctgctc ccctcctaaa gctatgcatt ttataagac catgggactt 3180
 ttgctggctt tagatctgat ctttgtgaag gaaccttact tctgtggtgt gacataattg 3240
 gacaactac ctacagagat ttaagctct aaggtaaata taatttttt aagtgtataa 3300
 tgtgttaaag tactgattct aattgtttgt gtattttaga ttccaacct tggaactgat 3360
 gaatgggagc agtggtgga tgcctttaat gaggaaaacc tgttttgctc agaagaaatg 3420
 ccatctagt atgatgagg tactgctgac tctcaacatt ctactcctcc aaaaaagaag 3480

```

agaaggtag aagaccccaa ggactttcct tcagaattgc taagtttttt gagtcatgct 3540
gtgttttagta atagaactct tgcttgcttt gctatttaca ccacaaagga aaaagctgca 3600
ctgctataca agaaaattat ggaaaaatat tctgtaacct ttataagtag gcataacagt 3660
tataatcata acatactggt ttttcttact ccacacaggc atagagtgtc tgctattaat 3720
aactatgctc aaaaattgtg taccttttagc tttttaattt gtaaaggggt taataaggaa 3780
tatttgatgt atagtgoctt gactagagat cgtacataat cagccatacc acatttgtag 3840
aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga 3900
atgcaattgt tgttggtaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 3960
gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca 4020
aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tcggctggat gatcctccag cgcggggatc 4080
tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat 4140
aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg 4200
gtttgtccaa actcatcaat gtatcttata atgtctgtat accgtcgacc tctagctaga 4260
gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc 4320
cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgaact 4380
aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc 4440
agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt 4500
ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag 4560
ctcactcaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca 4620
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt 4680
tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc 4740
gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctcc ctctgctgct 4800
ctcctgttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg 4860
tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca 4920
agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgogcetta tcgggtaact 4980
atcgtcttga gtcaccccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 5040
acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta 5100
actacggcta cactagaagg aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc 5160
ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt 5220

```

ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcccttg 5280
 atcttttcta cgggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc 5340
 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa 5400
 tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtga 5460
 gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg 5520
 tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga 5580
 gaccacagct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgag 5640
 cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa 5700
 gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc 5760
 atcgtgggtg cacgctctgc gtttggatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca 5820
 aggcgagtta catgatccc catgttctgc aaadaagcgg ttagctcctt cggctctccg 5880
 atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat 5940
 aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc 6000
 aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga cagagttgct cttgcccggc gtcaatacgg 6060
 gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg 6120
 gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 6180
 gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 6240
 ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata 6300
 ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac 6360
 atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa 6420
 gtgccacctg acgtc 6435

<210> 5
 <211> 6435
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificial sequence

<400> 5
 ctgcctagcc ctctagacga tcggggccac tggactccgc gcggccgaag cttatcggtc 60
 tcattggaaa aaaaattta aataaataa aataaaaact ctacctcaa ccgcggctag 120
 agggctaggg gataccagct gagagtcag ttagacgaga ctacggcgta tcaattcgg 180
 catagacgag ggacgaacac acaacctcca gcgactcatc acgcgctcgt tttaaattcg 240

atgttggtcc gttccgaact ggctgttaac gtactttctta gacgaatccc aatccgcaaa	300
acgcgacgaa gcgctacatg cccggtctat atgcgcaact gtaactaata actgatcaat	360
aattatcatt agttaatgcc ccagtaatca agtatcgggt atatacctca aggcgcantg	420
tattgaatgc catttaccgg ggggaccgac tggcgggttg ctgggggagg gtaactgcag	480
ttattactgc atacaagggt atcattgcgg ttatccctga aaggtaactg cagttaccca	540
cctcataaat gccatttgac ggggtgaaccg tcatgtagtt cacatagtat acggttcagt	600
cgggggataa ctgcagttac tgccatttac cgggcggacc gtaatacggg tcatgtactg	660
gaataccctg aaaggatgaa ccgtcatgta gatgcataat cagtagcgat aatggtagca	720
ctaogccaaa accgtcatgt agttaccgc acctatcgcc aaactgagtg cccctaaagg	780
ttcagagggtg gggtaactgc agttaccctc aaacaaaacc gtggtttttag ttgccctgaa	840
aggttttaca gcattgttga gggggggtaa ctgcgtttac ccgccatccg cacatgccac	900
cctccagata tattcgtctc gagagaccga ttgatctctt ggggtgacgaa tgaccgaata	960
gctttaatta tgctgagtga tatccctctg ggttcgaata gttgttcama catgtttttt	1020
cgtcogacca tggtagcttc ggggtcaggt cgaagagaag gaggacgatg agaccgaggg	1080
tctatggtgg cctctttaac acaactgtgt cagaggtcgg tgggacagaa acagaggccc	1140
cctttctcgg tgggagagga cgtcccggtc agtctcacia tgcctgatga atcggaccat	1200
ggttgtcttt ggaccgggtc gagggtcoga ggagtagata ctacgtaggt tgtcccggtg	1260
accgtaggggt cgggtccaagt caccgtcacc cagaccctgt ctgaagtgag agtggtatgc	1320
gtcggatctc ggacttctaa aadgtcaaat aatgacagt ctcgcctcgt tgaccggagg	1380
ccgcgagtga aagccgcctc cctggttcca cctctagtgt gcatgccacc gacgtggtag	1440
acagaagtag aagggcggta gactactcgt caactttaga ccttgacgga gacaacacac	1500
ggacgactta ttgaagatag ggtctctccg gtttcatgtc accttccacc tattgcggga	1560
ggttagccca ttgagggtcc tctcacagt tctcgtctc tcttctctgt cgtggatgtc	1620
ggagtcgtcg tgggactgcg actcgtttcg tctgatgtc tttgtgttc agatgcggac	1680
gcttcagtgg gtagtcccg actcagcgg gcagtgttc tcgaagtgt cccctctcac	1740
aatctgggtc gaaagaacat gttcaccaa ctagatctcc cgggataaga tatcacagt	1800
gatttacgat ctcgagcgac tagtcggagc tgacacgga gatcaacgg cggtagacaa	1860
caaacgggga gggggcacgg aaggaaactg gaccttccac ggtgagggtg acaggaaagg	1920
attattttac tcctttaacg tagcgtaca gactcatcca cagtaagata agaccccca	1980

ccccaccccg tcctgtcgtt cccctccta acccttctgt tatcgtccgt acgacccta 2040
cgccacccga gataccgaag actccgcctt tcttggtcga ccccgagatc ccccataggg 2100
gtgcgcggga catcgccgcg taattcgcg cgccacacc accaatgcgc gtcgcactgg 2160
cgatgtgaac ggtcgcggga tcgcgggcga ggaagcgaa agaagggag gaaagagcgg 2220
tgcaagcggc cgggagagtt ttttcocctt ttttcgtacg tagagttaat cagtgcgttg 2280
tatcagggcg gggattgagg cgggtagggc ggggattgag gcgggtcaag gcgggtaaga 2340
ggcgggggtac cgactgatta aaaaaataa atacgtctcc ggctccggcg gagccggaga 2400
ctcgataagg tcttcacac tcctccgaaa aaacctccgg atccgaaaac gtttttcgaa 2460
ccccctgtc gagtcccgac gctaaagcgc gggttgaact gccgttagga tcgcacttcc 2520
gaccatccta aaataggggc gacggtagta ccaagctggt aacttgacgt agcagcggca 2580
cagggtttta taccctaac cgttcttgcc tctggatggg accggaggcg agtccttgc 2640
caagttcatg aaggtttctt actggtgttg gagaagtcac cttccatttg tcttagacca 2700
ctaataccca tccttttga ccaagagga aggactcttc ttagctggaa atttcctgtc 2760
ttaattatat caagagtcac ctcttgagtt tcttggtggt gtcctcgag taaaagaacg 2820
gttttcaaac ctactacgga attctgaata acttggtggc cttaccgtt catttcatct 2880
gtaccaaac tatcagcctc cgtcaagaca aatggtcctt cggtagtag ttggtccgg 2940
ggagtctgag aaacactgtt cctagtagct ccttaactt tcaactgtga aaaagggct 3000
ttaactaac ccctttatat ttgaagaggg tcttatgggt ccgcaggaga gactccagg 3060
cctcctttt ccgtagttca tattcaaact tcagatgctc ttctttctga ttgtccttct 3120
acgaagttc aagagacgag gggaggattt cgatacgtaa aaatattctg gtaccctga 3180
aacgaccga atctagacta gaaacacttc cttggaatga agacaccaca ctgtattaac 3240
ctgtttgatg gatgtctcta aatttcgaga ttccatttat attttaaaaa ttcacatatt 3300
acacaatttg atgactaaga ttaacaaaca cataaaatct aaggttggt accttgacta 3360
cttaccctcg tcaccacctt acggaaatta ctcttttgg acaaaacgag tcttctttac 3420
ggtagatcac tactactccg atgacgactg agagttgtaa gatgaggagg tttttcttc 3480
tctttccatc ttctgggggt cctgaaagga agtcttaacg attcaaaaaa ctcagtacga 3540
cacaatcat tatcttgaga acgaacgaaa cgataaatgt ggtgtttcct ttttcgacgt 3600
gacgatatgt tcttttaata ctttttata agacattgga aatattcatc cgtattgtca 3660
atattagtat tgtatgacaa aaaagaatga ggtgtgtccg tatctcacag acgataatta 3720
ttgatacgag tttttaacac atggaaatcg aaaaattaaa catttcccca attattcctt 3780

ataaactaca tatcacggaa ctgatctcta gctagtatta gtcggtatgg tgtaaacatc 3840
 tccaaaatga acgaaatttt ttggaggggtg tggaggggga ctgggacttt gtattttact 3900
 tacgttaaca acaacaattg aacaaataac gtcgaatatt accaatgttt atttcgttat 3960
 cgtagtggtt aaagtgttta ttctgtaaaa aaagtgacgt aagatcaaca ccaaacaggt 4020
 ttgagtagtt acatagaata gtacagacct agccgacctt ctagggaggtc gcgcccctag 4080
 agtacgacct caagaagcgg gtgggggtga acaataacg tcgaatatta ccaatgttta 4140
 ttctgttatc gtagtggtta aagtgtttat ttctgtaaaa aagtgacgta agatcaacac 4200
 caaacaggtt tgagtagtta catagaatag tacagacata tggcagctgg agatcgatct 4260
 cgaaccgcat tagtaccagt atcgacaaag gacacacttt aacaataggc gagtgttaag 4320
 gtgtgttgta tgctcgccct tcgtatttca ctttcggac cccacggatt actcactcga 4380
 ttgagtgtta ttaacgcaac gcgagtgcg ggcgaagggt cagccctttg gacagcacgg 4440
 tcgacgtaat tacttagccg gttgcgcgcc cctctccgcc aaacgcataa cccgcgagaa 4500
 ggcgaaggag cgagtgcgtg agcgacgcga gccagcaagc cgacgcgcgt cgccatagtc 4560
 gagtgcgttt ccgccattat gccaataggc gtcttagtcc cctattgcgt cctttcttgt 4620
 aactcgttt tccggtcgtt ttccggtcct tggcattttt ccggcgcaac gaccgcaaaa 4680
 aggtatccga ggcgggggga ctgctcgtag tgtttttagc tgcgagttca gtctccaccg 4740
 ctttgggctg tcctgatatt tctatggtcc gcaaggggg accttcgagg gacacgcga 4800
 gaggacaagg ctgggacggc gaatggccta tggacagggc gaaagagggg agcccttcgc 4860
 accgcgaagg agtatcgagt gcgacatcca tagagtcaag ccacatccag cagcgaagg 4920
 tcgacccgac acacgtgctt ggggggcaag tcgggctggc gacgcggaat aggccattga 4980
 tagcagaact caggttgggc cattctgtgc tgaatagcgg tgaccgtcgt cggtgaccat 5040
 tgtcctaata gtctcgctcc atacatccgc cccgatgtct caagaacttc accaccggat 5100
 tgatgccgat gtgatcttcc ttgtcataaa ccatagacgc gagacgactt cggccaatgg 5160
 aagccttttt ctcaaccatc gagaactagg ccgtttgttt ggtggcgacc atcgccacca 5220
 aaaaaacaaa cgttcgtcgt ctaatgcgcg tctttttttc ctagagttct tctaggaac 5280
 tagaaaagat gcccagact gcgagtcacc ttgcttttga gtgcaattcc ctaaaaccag 5340
 tactctaata gtttttcta gaagtggatc taggaaaatt taatttttac ttcaaaattt 5400
 agttagattt catatatact catttgaacc agactgtcaa tggttacgaa ttagtcactc 5460
 cgtggataga gtcgctagac agataaagca agtaggtatc aacggactga ggggcagcac 5520

atctattgat gctatgccct cccgaatggt agaccggggt caccacgcta ctatggcgct 5580
 ctgggtgcga gtggccgagg tctaaatagt cgttatttgg tcggtcggcc ttcccggctc 5640
 gcgtcttcac caggacgttg aaataggcgg aggtaggcca gataattaac aacggccctt 5700
 cgatctcatt catcaagcgg toaattatca aacgcgttgc aacaacggta acgatgtccg 5760
 tagcaccaca gtgcgagcag caaaccatac cgaagtaagt cgaggccaag ggttgctagt 5820
 tccgctcaat gtactagggg gtacaacacg ttttttcgcc aatcgaggaa gccaggaggg 5880
 tagcaacagt cttcattcaa ccggcgctac aatagttagt accaataccg tcgtgacgta 5940
 ttaagagaat gacagtacgg taggcattct acgaaaagac actgaccact catgagttgg 6000
 ttcagtaaga ctcttatcac atacgccgct ggctcaacga gaacggggccg cagttatgcc 6060
 ctattatggc gcggtgtatc gtcttgaaat tttcacgagt agtaaccctt tgcaagaagc 6120
 cccgcttttg agagttccta gaatggcgac aactctaggt caagctacat tgggtgagca 6180
 cgtgggttga ctagaagtcg tagaaaatga aagtggtcgc aaagaccacac tcgtttttgt 6240
 ccttccgttt tacggcgctt tttcccttat tcccgtgtg cctttacaac ttatgagtat 6300
 gagaaggaaa aagttataat aacttcgtaa atagtcccaa taacagagta ctgcctatg 6360
 tataaactta cataatctt tttatttgtt tatccccaag gcgcgtgtaa aggggctttt 6420
 cacggtggac tgcag 6435

<210> 6
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificial sequence

<400> 6

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

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

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

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
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 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Pro Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 7
<211> 1413
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence

<400> 7
atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcaactac agcagtgggg cgaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccttcacc 120
tgcgctgtct atggtgggtc cttcagtggg tactactgga gctggatacg ccagtcccca 180

gagaaggggc tggagtggat tggggaatc aatcatggtg gatacgtcac ctacaatccg 240
 tccctcgaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
 ctgagctctg tgacogccgc ggacacggct gtatattact gtgcgaggga ctatggtccg 360
 ggggaattatg actggtactt cgatctctgg ggccgtggca cctggtcac tgtctcctca 420
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc cogaaccggg gacggtgtcg 540
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctcctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacacceagg tggacaagag agttgagccc 720
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 780
 ccgtcagttt tctcttccc cccaaaacc anggacccc tcatgatctc ccggaccct 840
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac 960
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020
 gagtacaagt gcaaggctct caacaagcc ctcacagccc ccatcgagaa aacctctcc 1080
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 1140
 ctgaccaaga accaggctag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa ggcaggtgg 1320
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgdacaa cactacacg 1380
 cagaaagagcc tctccctgtc ccggggtaaa tga 1413

<210> 8
 <211> 1413
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificial sequence

<400> 8
 tactttgtgg acaccaagaa ggaggaggac caccgtcgag ggtctacca ggacagggtc 60
 cacgttgatg tcgtacccc gcgtcctgac aacttcggaa gcctctggga caggaggtgg 120
 acgcgacaga taccaccag gaagtcacca atgatgacct cgacctatgc ggtcaggggt 180
 ctcttccccg acctcaccta accccttag ttagtaccac ctatgcagtg gatgttaggc 240

```

aggagctct cagctcagtg gtatagtcac ctgtgcaggt tcttggtcaa gagggacttc 300
gactcgagac actggcggcg cctgtgccga catataatga cacgctccct gataccaggc 360
cccttaatac tgaccatgaa gctagagacc ccggcacccgt gggaccagtg acagaggagt 420
cggaggtggt tcccgggtag ccagaagggg gaccgtggga ggaggttctc gtggagaccc 480
ccgtgtcggc gggacccgac ggaccagttc ctgatgaagg ggcttggcca ctgccacagc 540
accttgagtc cgcgggactg gtgcgcgcac gtgtggaagg gccgacagga tgtcaggagt 600
cctgagatga gggagtcgtc gcaccactgg cacgggaggt cgtcgaaccc gtgggtctgg 660
atgtagacgt tgcaactagt gttcgggtcg ttgtggttcc acctgttctc tcaactcggg 720
tttagaacac tgttttgagt gtgtacgggt ggcacgggtc gtggacttga ggaccccccct 780
ggcagtcaga aggagaaggg gggttttggg ttctgtggg agtactagag ggcctgggga 840
ctccagtgtc cgcaccacca cctgcactcg gtgcttctgg gactccagtt caagttgacc 900
atgcacctgc cgcacctcca cgtattacgg ttctgtttcg gcgccctcct cgtcatgttg 960
tcgtgcatgg cacaccagtc gcaggagtgg caggacgtgg tctgaccga cttaccgttc 1020
ctcatgttca cgttcagag gttgtttcgg gagggtcggg ggtagctctt ttggtagagg 1080
tttcggtttc ccgtcggggc tcttggtgtc cacatgtggg acgggggtag ggcctactc 1140
gactggttct tggteagtc ggaactggacg gaccagtttc cgaagatagg gtcgctgtag 1200
cggcacctca cctctcgtt acccgtcggc ctcttggtga tgttctggtg cggagggcac 1260
gacctgaggc tgccgaggaa gaaggagatg tcgttcgagt ggcacctgtt ctcgtccacc 1320
gtcgtccctc tgcaagaag tacgaggcac tacgtactcc gagacgtgtt ggtgatgtgc 1380
gtcttctcgg agagggacag gggcccattt act 1413

```

<210> 9
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificial sequence

<400> 9

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

Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys
			20					25					30		

76
65

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

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

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

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

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

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

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

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

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

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

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

VERSION CORREGIDA

(19) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
WIPO
OMPI
PCT

(43) Fecha de Publicación Internacional
21 de Abril de 2005 (21.04.2004)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/035584 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷ C07K 16/28

(21) Número de Solicitud Internacional PCT/US2004/033587

(22) Fecha de Presentación Internacional
12 de Octubre de 2004 (12 10 2004)

(25) Lenguaje Presentado Inglés

(26) Lenguaje de Publicación Inglés

(30) Fecha de Prioridad
60/510,193 10 de Octubre de 2003 (10 10 2003) US
10/961,567 8 de Octubre de 2004 (08 10 2004) US

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto US)
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US] Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventores, y
(75) Inventor/Solicitante (solamente para los US) JURE-KUNKEL, Maria [U/Y/US] 31 Silvers Lane, Plainsboro, NJ 08536 (US) HEFTA Laura, J [US/US] 18 Park Avenue, Pennington, NJ 08534 (US) SANTORO, Marc [US/US] 149 North Main St. Yardley PA 19067 (US) GANGULY Subhany [IN/US] 7 Thornbury Lane, Newtown, PA 18940 (US) HALK, Edward, L. [-/US] 1004 Edmonds Court, Sunnyvale, CA 94087 (US)

(74) Agente GOLIAN Paul, D. et al Bristol Myers Squibb Company P O Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Estados Designados (a menos que de lo contrario se indique para cada clase de protección nacional disponible) AE, AG AL, AM, AT, AU AZ, BA, BB, BG BR, BW BY BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG ES FI GB, GD, GE, GH, GM HR, HU ID IL, IN IS JP KE, KG, KP KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT LU LV MA, MD MG MK, MN MW MX MZ, NA, NI NO, NZ, OM, PG PH, PL, PT RO RU SC SD, SE, SG, SK, SL, SY TJ TM, TN TR, TT TZ, UA, UG US UZ, VC VN YU ZA, ZM, ZW

(84) Estados Designados (a menos que de lo contrario se indique para cada clase de protección nacional disponible) patente ARIPO (BW GH GM KE, LS, MW MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG ZM ZW), patente Euranítica (AM AZ, BY KG KZ, MD RU TJ TM), patente Europea (AT BE, BG CH, CY CZ, DE, DK, EE, ES, FI FR, GB, GR, HU IE, IT LU MC NL, PL, PT RO SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF BJ CF CG CI CM GA, GN GQ, GW ML, MR, NE, SN TD TG)

Declaración bajo la Regla 4.17
como derecho del solicitante para aplicar y otorgar una patente (Regla 4.17(ii)) para las siguientes designaciones AE, AG AL, AM AT AU AZ, BA BB, BG BR, BW BY BZ, CA CH CN CO CR, CU CZ, DE, DK DM DZ, EC, EE, EG ES, FI GB, GD, GE, GH GM HR, HU ID, IL, IN IS, JP KE, KG KP KR, KZ, LC LK, LR, LS, LT LU LV MA MD, MG MK MN MW MX MZ, NA NI NO, NZ, OM PG PH PL, PT RO, RU SC, SD, SE, SG SK, SL, SY TJ TM TN TR, TT TZ, UA UG UZ, VC, VN YU ZA ZM ZW patente ARIPO (BW GH GM KE, LS, MW MZ, NA SD, SL, SZ, TZ, UG ZM ZW) patente Euranítica (AM AZ, BY KG KZ, MD, RU TJ TM) patente Europea (AT BE, BG CH CY CZ, DE, DK, EE, ES, FI FR, GB, GR, HU IE, IT LU MC, NL, PL, PT RO SE, SI SK, TR) patente OAPI (BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ, GW ML, MR, NE, SN TD TG)
para el derecho del solicitante de reclamar la prioridad de la solicitud más temprana (Regla 4.17(iii)) para todas las designaciones

Publicada
Con el reporte de búsqueda internacional
(48) Fecha de publicación de la versión corregida
26 de Enero de 2006

(15) Información sobre la Corrección
vea la Gaceta del PCT No 04/2006 del 26 de Enero de 2006, Sección II

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones referirse a Notas de Guía de Códigos y Abreviaturas que aparece al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta del PCT

(54) Título ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA EL 4-1BB HUMANO (CD137)

(57) Resumen Anticuerpos completamente humanos y porciones de enlace de antígenos de los mismos que se enlazan al 4-1BB humano y que permiten el enlace del 4-1BB humano al ligando 4 1BB humano En un aspecto el anticuerpo es el anticuerpo IgG4 También se suministra un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo al sujeto

ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA 4-1BB HUMANO (CD137)Campo de la Invención

La invención se refiere a anticuerpos completamente humanos y más específicamente a anticuerpos completamente humanos para el 4-1BB humano (CD137)

Antecedentes de la Invención

Un amplio cuerpo de evidencia ha demostrado sin equivocarse que existe cierto grado de respuesta inmunitaria contra el cáncer en humanos y animales. En pacientes con cáncer los componentes celulares del sistema inmunitario pueden reconocer antígenos expresados por células de tumor tal como la diferenciación de antígenos oncofetales o productos de genes mutados (S Rosenberg Nature 411 380-4 (2000)). Diversos estudios clínicos han demostrado que los linfocitos que infiltran al tumor tienen una importancia favorable de pronóstico (E Halapi Med Oncol 15(4) 203-11 (1998) J Resser et al Curr Opin Oncol 10 226 (1998) D Elder Acta Oncol 38 535 (1999) L Zhang et al N E J Med 348(3) 203-13 (2003)). Adicionalmente los tratamientos clínicos con inmunomoduladores tal como citocinas o productos bacterianos vacunas de cáncer o inmunoterapia adoptiva han conducido a una regresión de tumores en diversos pacientes (S Rosenberg Cancer J Sci Am 6(S) 2 (2000) P Bassi Surg Oncol 11(1-2) 77-83

REF: 171359

(2022) S Antonia et al Current Opinion in Immunol
16 130-6(2004)) A pesar de estas respuestas la inmunidad
contra el cáncer frecuentemente falla para eliminar
efectivamente las células de tumor Las causas para esta
5 falla se pueden agrupar en tres categorías principales (i)
reconocimiento deteriorado a tumor por las células
inmunitarias ya sea por expresión variable de antígenos tumorales o
expresión reducida del complejo de histocompatibilidad principal clase
I (MHC) (ii) microambiente tumoral inmunosupresor como resultado de
10 secreción de citocinas inhibidoras por células tumorales (por
ejemplo TGF-beta) y (iii) pobre inmunogenicidad tumoral
debido a carencia de expresión de moléculas co-estimuladoras
en células tumorales que da por resultado la incapacidad de
las células tumorales para estimular efectivamente células T
15 Los avances recientes en nuestro entendimiento de los
requerimientos para el reconocimiento de antígenos tumorales
y la función inmunitaria del efector indican que una
estrategia exitosa potencial para mejorar una respuesta
inmunitaria anti-tumor es suministrar la co-estimulación a
20 través de una molécula auxiliar Las células T específicas de
antígeno de tumor requieren co-estimulación para iniciar y
mantener funciones efectoras De esta manera las terapias
que seleccionan como objetivo moléculas co estimuladoras se
pueden aplicar para modular y mejorar la respuesta
25 inmunitaria a tumores

El modelo actual para la activación de células T postula que las células T simples requieren de dos señales para una activación completa (i) una señal suministrada a través del enlace de antígenos procesados presentados al receptor de células T por un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de moléculas de clase I y (ii) una señal adicional suministrada por la interacción de moléculas co-estimuladoras en la superficie de las células T y sus ligandos en las células que presentan antígenos. El reconocimiento de un antígeno por una célula T nueva es insuficiente en sí mismo para disparar la activación en células T. Sin una señal co-estimuladora se pueden eliminar las células T por muerte o por inducción de energía. La señalización a través de la molécula co-estimuladora CD28 parece ser la clave para el inicio de las respuestas de células T. Sin embargo la señalización de CD137 (4-1BB) ha demostrado ser primordial para el mantenimiento y expansión de la respuesta inmunitaria a antígenos así como para la generación de células T de memoria.

El CD137 (4-1BB) es un miembro del receptor de necrosis del tumor (TNF-R) en la familia de genes que incluye proteínas involucradas en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y muerte celular programada. El CD137 es una glicoproteína de membrana de tipo I de 30 kDa expresada como un homodímero de 55kDa. El

receptor se describió inicialmente en ratones (B Kwon et al P N A S USA 86 1963-7 (1989)) y después se identificó en humanos (M Alderson et al Eur J Immunol 24 2219-27 (1994) Z Zhou et al Immunol Lett 45 67 (1995)) (Ver también solicitudes PCT publicadas WO95/07984 y WO96/29348 y patente de los Estados Unidos No 6 569 997 incorporada en la presente como referencia (Ver SEQ ID NO 2)) La forma humana y murina de CD137 es 60% idéntica a nivel de aminoácidos Las secuencias conservadas se presentan en el dominio citoplásmico así como en las otras 5 regiones de la molécula lo que indica que estos residuos pudieran ser importantes para el funcionamiento de la molécula CD137 (Z Zhou et al Immunol Lett 45 67 (1995)) La expresión de CD137 ha demostrado ser predominantemente en células de linaje linfoide tales como células T activadas células de exterminio natural activadas (NK) células NKT células T reguladoras de CD4CD25 y también en timocitos activados y linfocitos intraepiteliales Además CD137 también ha demostrado que se expresa en células de origen mieloide como las células dendríticas monocitos neutrofilos y eosinófilos Aunque la expresión de CD137 se restringe principalmente a células inmunes/inflamatorias han existido informes que describen su expresión en células endoteliales asociadas con un número pequeño de tejidos a partir de sitios inflamatorios y tumores

Las actividades funcionales de CD137 en las células T se han caracterizado ampliamente. La señalización a través de CD137 en presencia de dosis subóptimas de anti-CD3 se ha demostrado que induce proliferación de células T y la síntesis de citocinas (principalmente IFN- γ) y para inhibir la muerte celular activada. Estos efectos se han observado con células T humanas y murinas (W Shuford et al J Exp Med 186(1) 47-55 (1997) D Vinay et al Semin Immunol 10(6) 481-9 (1998) D Laderach et al Int Immunol 14(10) 1155-67 (2002)). Tanto en humanos como en ratones la co-estimulación mejora las funciones del efector tal como la producción de IFN- γ y la citotoxicidad al aumentar los números de células T CD8+ del efector y específica del antígeno. En ausencia de la señalización anti-CD3 la estimulación a través de CD137 no altera la función de células T lo que indica que CD137 es una molécula co estimuladora.

Los eventos fisiológicos observados que siguen a la estimulación de CD137 en las células T están mediados por las señales de NF κ B y PI3K/ERK1/2 con funciones fisiológicas separadas. Las señales NF- κ B disparan la expresión de Bcl- κ L una molécula anti-apoptótica dando por resultado de esta manera una supervivencia aumentada mientras que las señales PI3K y ERK1/2 son específicamente responsables del avance del ciclo de células mediado por CD137 (H Lee et al J Immunol 169(9) 4882-8 (2002)). El efecto de la activación

de CD137 en la inhibición de la muerte celular inducida por la activación se muestra in vitro por Hurtado et al (J Hurtado et al J Immunol 158(6) 2600-9 (1997)) y en un sistema in vivo en el cual los anticuerpos monoclonales anti-
5 CD137 (mabs) se muestra que producen una supervivencia de larga duración de las células T CD8+ activadas por el superantígeno al prevenir la eliminación clónica (C Takahashi et al J Immunol 162 5037 (1999))
Posteriormente dos informes demostraron bajo diferentes
10 condiciones experimentales que la señal CD137 regula la expansión clonal y la supervivencia de la célula CD8+ (D Cooper et al Eur J Immunol 32(2) 521-9 (2002) M Maus et al Nat Biotechnol 20 143 (2002)) La apoptosis reducida observada después de la co- estimulación se
15 correlaciona con niveles crecientes de Bcl-_{XL} en las células CD8+T mientras que la expresión de Bcl-2 permanece sin cambio El favorecimiento de la expresión de los genes anti-apoptosis Bcl-_{XL} y bfl-1 via 4-1BB se muestra que está mediada por la activación NF- κ B ya que PDTC un bloqueador
20 específico de NF- κ B inhibe la sobre-regulación mediada por 4-1BB de Bcl-_{XL} (H Lee et al J Immunol 169(9) 4882-8 (2002)) Por otro lado la expansión clónica de las células T activadas parece estar mediada por una expresión aumentada de la ciclinas D2 D3 y E y la reducción de la expresión de la
25 proteína p27^{kip1} Este efecto se presenta en una forma

dependiente e independiente del IL-2 (H Lee et al J Immunol 169(9)4882-8 (2002))

En conjunto la estimulación CD137 resulta en una expansión aumentada supervivencia y funciones del efector de células CD8+T recientemente cebadas que actúan en parte directamente en estas células Ambas células T CD4+ y CD8+ se ha demostrado que responden a la estimulación CD137 sin embargo parece que la mejora de la función de la célula T es mayor que la célula CD8+ (W Shuford et al J Exp Med 186(1) 47-55 (1997) I Gramaglia et al Eur J Immunol 30(2) 392-402 (2000) C Takahashi et al J Immunol 162 5037 (1999)) Con base en el rol crítico de la estimulación CD137 en la función y la supervivencia de las células CD8+T la manipulación del sistema CD137/ CD137L proporciona un método plausible para el tratamiento de tumores y patógenos virales

Recientemente la expresión constitutiva de CD137 en células dendríticas recientemente aisladas (DC por sus siglas en inglés) se demuestra en ratones (R Wilcox et al J Immunol 169(8)4230-6(2002) T Futagawa et al Int Immunol 14(3) 275-86 (2002)) y en humanos (S Pauly et al J Leukoc Biol 72(1) 35-42(2002)) Estos informes muestran que la estimulación de CD137 sobre DC resulta en la secreción de IL-6 y IL-12 y más importantemente mejora la capacidad DC para estimular las respuestas de células T a los

aloantígenos Además Pan et al demostró que la
 señalización CD137 en DC resulta en el favorecimiento de la
 expresión de la clase I MHC y moléculas co-estimuladoras y
 produce una capacidad mejorada de DC para infiltrar tumores
 5 (P Pan et al J Immunol 172(8) 4779-89 (2004)) Por lo
 tanto la co-estimulación DC137 sobre DC parece ser una
 trayectoria novedosa para la proliferación maduración y
 migración de DC

Las células exterminadoras naturales activadas (NK
 10 por sus siglas en inglés) expresan CD137 que sigue a la
 estimulación con citocinas (I Melero et al Cell Immunol
 190(2) 167-72 (1998) R Wilcox et al J Immunol 169(8)
 4230-6 (2002)) Diversos informes demostraron que las células
 NK parecen ser críticas para la modulación de la respuesta
 15 inmunitaria antitumor inducida por anticuerpos agonistas
 CD137 (I Melero et al Cell Immunol 190(2) 167-72
 (1998) R Miller et al J Immunol 169(4) 1792-800
 (2002) R Wilcox et al J Immunol 169(8) 4230-6
 (2002)) La eliminación de las células NK reduce
 20 significativamente la actividad antitumor de anti-CD137 mabs
 El ligamiento de CD137 en las células NK induce la
 proliferación y secreción de IFN- γ pero no afecta su
 actividad citolítica Notablemente las células NK
 estimuladas por CD137 in vitro presenta una actividad
 25 inmunoreguladora o "de ayuda" para las células T citolíticas

CD8+ lo que resulta en la expansión de células T activadas
Por lo tanto la señalización CD137 en las células NK puede
modular la inmunidad innata a los tumores

Un efecto paradójico se ha descubierto para la
5 estimulación de CD137 en que los anticuerpos agonistas CD137
pueden inducir la supresión de las respuestas humorales a los
antígenos de células T en modelos de primates y de ratones
(H Hong et al J Immunother 23(6) 613-21 (2000) R
Mittler et al J Exp Med 190(10) 1535-40(1999))
10 Notablemente los anticuerpos antagónicos de CD137 se
mostraron que producen mejora significativa de los síntomas
asociados con enfermedades inmunitarias dependientes de
anticuerpos tal como lupus eritematoso sistémico y
encefalomielitis autoinmunitaria experimental (J Foell et
15 al N Y Acad Sci 987 230 5(2003) Y Sun et al Nat
Med 8(12) 1405 13(2002)) Recientemente Seo et al
demostró que en un modelo en ratón de artritis reumatoide
el tratamiento con anticuerpo antagónico anti-CD137 previno
el desarrollo de la enfermedad y notablemente bloqueó el
20 progreso de la enfermedad (S K Seo et al Nat Med
10 1099-94(2004)) El mecanismo responsable de este efecto no
se ha definido bien pero en este modelo de artritis
reumatoide se mostró que el tratamiento con un anticuerpo
antagónico anti-CD137 dio por resultado la expansión de
25 células T CD11C-CD8+ que producen IFN- γ IFN- γ estimuló a su

vez células dendríticas para producir indolamina-2,3-
dioxigenasa (IDO) que ejercen actividades inmunosupresoras.
También se ha postulado que la señalización CD137 en células
T CD4+ activadas con antígeno resulta en la inducción de la
secreción IFN- γ lo cual activa los macrófagos. Los macrófagos
activados pueden a su vez producir señales de muerte para las
células B. La señalización continua a través de las células
CD137 en las células T CD4+ puede posteriormente inducir la
muerte celular inducida por activación (AICD) de estas
células T activadas con CD4+. Por lo tanto al eliminar las
células B y las células T activadas con antígenos se observa
una respuesta reducida de anticuerpos y consecuentemente se
observa una reducción dramática de las enfermedades
inflamatorias mediadas por Th2 (B. Kwon et al. J Immunol
168(11): 5483-90 (2002)). Estos estudios sugieren un papel
para el uso de los anticuerpos agonistas CD137 para el
tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes sin
inducir una supresión general del sistema inmune.

El ligando natural para CD137 es el ligando CD137
(CD137L) un miembro de la glicoproteína de 34kDa de la
superfamilia TNF se detecta principalmente en las células
activadas que presentan antígenos (APC por sus siglas en
inglés) tales como células B, macrófagos, células
dendríticas y también en linfomas de murina, de células B,
células T activadas y líneas de carcinoma humano de origen

epitelial (R Goodwin et al Eur J Immunol 23(10) 2631-41 (1993) Z Zhou et al Immunol Lett 45 67 (1995) H Salih et al J Immunol 165(5) 2903-10(2002)) El CD137L humano comparte un 36% de homología con la contraparte murina (M Alderson et al Eur J Immunol 24 2219-27 (1994))

Además de suministrar señales a las células que expresan CD137 el enlace de CD137 a CD137L inicia una señal bidireccional que resulta en efectos funcionales en las células que expresan CD137L Langstein et al demostró que el enlace de la proteína de fusión CD137-Ig a CD137L en los monocitos activados indujo la producción de IL-6 IL-8 y TNF- α sobrerreguló el ICAM e inhibió IL-10 lo que resulta en una adherencia aumentada (J Langstein et al J Immunol 160(5) 2488-94 (1998)) Además la proliferación de monocitos se demostró junto con una relación superior de apoptosis (J Langstein et al J Leukoc Biol 65(6) 829-33(1999)) Estas observaciones se confirmaron por los estudios de Ju et al (S Ju et al Hybrid Hybridomics 22(5) 333-8(2003)) que mostraron que un anticuerpo funcional anti- CD137L indujo una elevada relación de proliferación de monocitos de sangre periférica El bloqueo de ligando resultó en una inhibición de la activación de las células T Además se encontró CD137L soluble en el suero de pacientes con artritis reumatoide y malignidades hematológicas (H Salin et al Immunol 167(7) 4059-66(2001)) Así la interacción de CD137 con CD137L tiene influencia y produce efectos funcionales en la célula T y en APC

En otro aspecto importante de la función de células T se ha demostrado que los anticuerpos agonistas anti-CD137 rescataron las respuestas de células T para antígenos de proteína en ratones envejecidos. Se ha documentado bien que sucede una declinación relacionada con la edad en las respuestas inmunitarias para antígeno, un proceso conocido como inmunosenectud (R. Miller, Science 273:70-4 (1996); R. Miller, Vaccine 18:1654-60 (2000); F. Hankins et al., Curr. Opin. Immunol. 16:151-156 (2004)). Este fenómeno parece deberse a alteraciones en el equilibrio entre el grado de la expansión celular y la supervivencia o muerte celular. Bansal-Pakala et al. probaron la hipótesis de que la co-estimulación secundaria a través de CD137 se puede utilizar para mejorar la respuesta de células T en situaciones en donde las células T no reciben estimulación suficiente debido a su expresión reducida de CD3 o CD28 o una calidad reducida de señales. Sus estudios mostraron que los ratones envejecidos tenían una respuesta de retoma deficiente in vitro en comparación con los ratones jóvenes (P. Bansal-Pakala et al., J. Immunol. 169(9):5005-9 (2002)). Sin embargo, cuando los ratones envejecidos se trataron con anti-CD137 mAbs, las respuestas proliferativas y de citocina de las células T fueron idénticas a las respuestas observadas en ratones jóvenes. Aunque no se obtuvo el mecanismo específico responsable para este efecto, se especuló que la mejora de la

expresión de las moléculas anti-apoptóticas como Bcl-_x y la promoción de la secreción IL-2 in vivo pueden jugar un papel en el rescate de las respuestas de células T defectuosas. Estos estudios demostraron el potencial para anticuerpos anti-CD137 agonistas para rescatar respuestas débiles de células T en individuos inmunocomprometidos de mayor edad y tiene profundas implicaciones para el uso de anticuerpos anti-CD137 en pacientes con cáncer.

Se sugiere un función para la terapia dirigida a CD137 en el tratamiento de cáncer por medio de estudios de eficacia in vivo en ratones utilizando los anticuerpos monoclonales CD137 antimurino de agonista. En un documento por Melero et al el anticuerpo CD137 de antirratón agonista produce curas en el mastocitoma P815 y un modelo de tumor inmunogénico bajo Ag104 (I Melero et al Nat Med 3(6) 682-5 (1997)). El efecto antitumor requiere células CD4+ y CD8+ y células NK ya que la supresión selectiva in vivo de cada subpoblación resulta en la reducción o pérdida completa del efecto antitumor. También se demostró que una inducción misma de una respuesta inmunitaria fue necesaria para la terapia anti-CD137 para que fuera efectiva. Varios investigadores han utilizado los anticuerpos anti-CD137 para demostrar la viabilidad de este método para la terapia de cáncer (J Kim et al Cancer Res 61(5) 2031-7(2001) O Martinet et al Gene Ther 9(12) 786-92 (2002) R Miller

et al J Immunol 169(4) 1792-800(2002) R Wilcox et al
Cancer Res 62(15) 4413-8 (2002))

En apoyo de los datos de eficacia antitumor con anticuerpos agonistas CD137 las señales suministradas por
5 CD137L han demostrado producir una actividad CTL y respuestas antitumor (M DeBenedette et al J Immunol 163(9) 4833-41 (1999) B Guinn et al J Immunol 162(8) 5003-10 (1999))
Diversos reportes demostraron que la transferencia de genes de ligando CD137 en carcinomas murinos resulta en un rechaz
10 de tumores lo que demuestra el requerimiento de la co-estimulación al generar una respuesta inmunitaria eficiente (S Mogi et al Immunology 101(4) 541-7 (2000) I Melero et al Cell Immunol 190(2) 167-72 (1998) B Guinn et al J Immunol 162(8) 5003-10 (1999)) Salih et al reportan la
15 expresión de CD137L en carcinomas humanos y líneas celulares de carcinoma humanos (H Salih et al J Immunol 165(5) 2903-10 (2002)) y demuestran que las células tumorales que expresan el ligando pudieran suministrar una señal c - estimuladora a las células T lo cual resulta en la liberación
20 de IFN- γ y IL-2 y que este efecto se correlaciona con los niveles de CD137L en tumores No se sabe si la expresión de CD137L en tumores humanos puede hacer a estos tumores más susceptibles a los anticuerpos agonistas CD137

Los ratones CD137-/- han acentuado la importancia
25 de un sistema CD137/ CD137L en respuesta para células T para

virus y tumores (M DeBenedette et al J Immunol
 163(9) 4833-41 (1991) J Tan et al J Immunol
 164(5) 2320-5 (2000) B Kwon et al J Immunol
 168(11) 5483-90 (2002)) Los estudios que usan ratones
 5 deficientes en CD137- y CD137L- han demostrado la importancia
 de la co-estimulación CD137 en enfermedad de injerto contra
 hospedador y las respuestas de células T citolíticas
 antivirales Los ratones deficientes en CD137 tuvieron una
 proliferación mejorada de células T pero una reducción en la
 10 producción de citocina y en la actividad de células T
 citotóxicas (B Kwon et al J Immunol 168(11) 5483-90
 (2002) D Vinay et al Immunol Cell Biol 81(3) 176-84
 (2003)) Más recientemente se demostró que los ratones
 agénicos (CD137-/-) tuvieron una frecuencia superior de
 15 metástasis de tumor (4 veces) en comparación con los ratones
 de control Estos datos sugieren que el restablecimiento de
 la señalización de CD137 por el uso de anticuerpos agonistas
 anti-CD137 es un método factible para aumentar las respuestas
 inmunitarias celulares a patógenos virales y cáncer

20 Además de los datos en los modelos de ratón in vivo
 que soportan la implicación de la señalización CD137 en
 respuestas inmunitarias antitumor los estudios efectuados en
 muestras de tumor humano primario han confirmado el papel de
 CD137 en la generación de células T efectoras En pacientes
 25 con un sarcoma de Ewing Zhang H et al mostraron que las

células T efectoras intratumorales presentaron el genotipo CD3+/CD8+/CD28-/CD137+ Inesperadamente la coexistencia de un crecimiento de tumor progresivo y la inmunidad antitumor (células T efectoras) se observaron Los estudios de estimulación ex vivo con células de pacientes demostraron que la proliferación de células T inducida por tumores y la activación requirieron de la coestimulación con CD137L La estimulación de PBL con anti-CD3/CD137L pero no con anti-CD3/anti-CD28 indujo efectores líticos de tumor Estos estudios suministraron evidencia adicional de que la coestimulación mediada con CD137 puede resultar en la expansión de CTL reactivos de tumor (H Zhang et al Cancer Biol Ther 2(5) 579-86(2003)) Además la expresión de CD137 se demostró en linfocitos infiltradores de tumor en carcinomas hepatocelulares (HCC) (Y Wan et al World J Gastroenterol 10(2) 195-9 (2004)) La expresión CD137 se detectó en 19 de cada 19 HCC por RT-PCR y en 13/19 por tinción de inmunofluorescencia De manera inversa el CD137 no se detectó en las células mononucleares periféricas de los mismos pacientes Los análisis efectuados en tejidos del hígado del donador saludable fracasaron al demostrar la expresión de CD137 Estos estudios no pretendían correlacionar la enfermedad clínica con la expresión de CD137 Así los estudios efectuados en el sarcoma de Ewing y carcinoma hepatocelular revelaron la presencia de TIL que expresa CD137

con un avance concomitante de la enfermedad En los sarcomas de Ewing se demostró que CD137+TILs pudieron exterminar células tumorales ex vivo lo que sugiere que la trayectoria CD137 estuvo intacta en estos pacientes y que tal vez los factores de supresión en el microambiente del tumor inhibieron su función Así se pueden postular que la administración sistémica de los anticuerpos agonistas CD137 puede suministrar la señal necesaria para la expansión de estas células T efectoras

Además de su papel en el desarrollo de la inmunidad para el cáncer se ha informado un papel para el CD137 en enfermedades autoinmunes y VIH (B Kwon et al Exp Mol Med 35(1) 8-16 (2003) H Salih et al J Immunol 167(7) 4059-66(2001) E Kwon et al P N A S USA 96 15074-79 (1999) J Foell et al N Y Acad Sci 987 230-5(2003) Y Sun et al Nat Med 8(12) 1405-13 (2002) S K Seo et al Nat Med 10 1099-94 (2004))

Consecuentemente con base en los roles de 4 1BB en la modulación de la respuesta inmunitaria sería deseable producir anticuerpos antihumanos 4-1BB con actividades agonistas que se puedan usar para el tratamiento o prevención de enfermedades humanas tales como el cáncer

Breve Descripción de la Invención

La presente invención proporciona anticuerpos completamente humanos que se enlazan al 4-1BB (H4-1BB) humano

y que permiten el enlace de H4-1BB al ligando 4-1BB humano (H4-1BBL) Así la invención se dirige a anticuerpos que se enlazan a H4-1BB y que no bloquean el enlace de H4-1BB a H4-1BBL con lo cual se permite en enlace de un anticuerpo de la invención y H4-1BBL a H4-1BB La invención también proporciona anticuerpos con actividades antagónicas ya que la unión de los anticuerpos a H4-1BB da por resultado una mejora y una estimulación de respuestas inmunitarias mediadas por H4-1BB Estos anticuerpos se pueden usar como inmuno-
mejoradores de una respuesta inmunitaria anti-tumor o anti-viral o como inmuno-moduladores de enfermedades auto-inmunitarias mediadas por células T Los anticuerpos se pueden usar también como herramientas de diagnóstico para la detección de H4-1BB en sangre o tejido de pacientes con
cáncer o enfermedades auto-inmunitarias u otras

En un aspecto la invención proporciona un anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo que se enlaza específicamente a H4-1BB que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada en donde la región variable de cadena ligera comprende un CDR1 (región determinante de la complementariedad 1) un CDR2 (región determinante de la complementariedad 2) y un CDR3 (región determinante de la complementariedad 3) como se detalla en la figura 4 y la
región variable de cadena pesada comprende un CDR1 (región

determinante de la complementariedad 1) un CDR2 (región determinante de la complementariedad 2) y un CDR3 (región determinante de la complementariedad 3) como se detalla en la figura 3 o la figura 7 EL anticuerpo monoclonal (mab) puede ser por ejemplo un anticuerpo IgG4 o anticuerpo IgG1

En otro aspecto la invención proporciona un anticuerpo monoclonal o porción de enlace a antígeno del mismo en donde la cadena ligera comprende una región variable como se detalla en la figura 4 y la cadena pesada comprende una región variable como se detalla en la figura 3 o figura 7

En otro aspecto la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera y una cadena pesada en donde la cadena ligera comprende residuos de aminoácidos 21-236 de SEQ ID NO 6 y la cadena pesada comprende residuos de aminoácidos 20-467 de SEQ ID NO 3 En otro aspecto la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera y una cadena pesada en donde la cadena ligera comprende residuos de aminoácidos 21-236 de SEQ ID NO 6 y la cadena pesada comprende residuos de aminoácidos 20-470 de SEQ ID NO 9

Los anticuerpos de la invención tienen aplicaciones terapéuticas como inmuno-moduladores de enfermedades tal como cáncer enfermedades auto-inmunitarias enfermedades inflamatorias y enfermedades infecciosas

La invención proporciona además métodos para tratar cáncer en un sujeto que comprende administrar una cantidad

terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención a
1 sujeto En un aspecto este método comprende además
administrar una vacuna una vacuna de ADN una vacuna de
células tumorales modificada con GM-CSF o una vacuna de
5 células dendríticas cargadas de antígeno El cáncer puede ser por
ejemplo cáncer de próstata melanoma o cáncer epitelial

En otro aspecto la invención proporciona un método para
mejorar la respuesta inmunitaria que comprende administrar un
anticuerpo de la invención y una vacuna de SIV gag En otro aspecto
10 la invención proporciona un método para mejorar la respuesta
inmunitaria que comprende administrar un anticuerpo de la
invención y una vacuna de PSA En otro aspecto la invención
proporciona un método para mejorar la respuesta inmunitaria a
una vacuna de SIV gag que comprende administrar un
15 anticuerpo de la invención En otro aspecto la invención
proporciona un método para mejorar la respuesta inmunitaria a
una vacuna de PSA que comprende administrar un anticuerpo de
la invención

La invención también proporciona composiciones
20 farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención o
una porción de enlace a antígeno del mismo y un portador
farmacéuticamente aceptable La composición farmacéutica se
puede administrar sola o en combinación con un agente p r
ejemplo un agente para tratar el cáncer tal como un agente
25 quimioterapéutico o una vacuna u otro agente immuno-

87

modulador

La invención también proporciona polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada de (a) nucleótidos que codifican para la
5 secuencia de aminoácidos de los residuos 20-467 de aminoácidos de SEQ ID NO 3 (b) nucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3 (c) nucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos de los residuos 21-236 de aminoácidos de SEQ ID NO 6 (d)
10 nucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 6 (e) nucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos de los residuos 20-470 de aminoácidos de SEQ ID NO 9 (f) nucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 9 y (g)
15 nucleótidos que codifican para un fragmento de la secuencia de aminoácidos de (a) a (f) tal como una región variable una región constante o una o más CDR Los polinucleótidos aislados de la invención comprenden además secuencia de nucleótidos que codifican para al menos una CDR de la Figura
20 3 al menos una CDR de la Figura 4 o al menos una CDR de la Figura 7 La invención proporciona además polinucleótidos aislados que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 1 SEQ ID NO 4 SEQ ID NO 7

La invención también proporciona polipéptidos
25 aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO 3 SEQ ID
NO 6 y SEQ ID NO 9 En otro aspecto la invención proporciona
polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de los
residuos 20-467 de aminoácidos de SEQ ID NO 3 polipéptidos
5 aislados que comprenden la secuencia de aminoácidos de los
residuos 21-236 de aminoácidos de SEQ ID NO 6 y polipéptidos
aislados que comprenden la secuencia de aminoácidos de los
residuos 20-470 de aminoácidos de SEQ ID NO 9 En otro
aspecto la invención proporciona polipéptidos aislados que
10 comprenden la secuencia de aminoácidos de al menos una CDR de
la Figura 3 Figura 4 o Figura 7 o al menos la región
variable o constante de la Figura 3 Figura 4 o Figura 7

La invención incluye además una inmunoglobulina que
tiene una especificidad de enlace para H4-1BB la
15 inmunoglobulina comprende una región de enlace de antígeno
En un aspecto la inmunoglobulina es una Fab o F(ab), de un
anticuerpo de la invención

La invención también incluye una línea celular que
produce un anticuerpo o porción de enlace a antígeno del
20 mismo de la invención vectores de expresión recombinante que
incluyen los nucleótidos de la invención y métodos para
elaborar los anticuerpos de la invención al cultivar una
línea celular productora del anticuerpo

Breve Descripción de las Figuras

25 La Figura 1 muestra un mapa de plásmido pD17-

20H4 9 h4a

La Figura 2 muestra un mapa de plásmido pD16puerta-20H4 9 LC

Las Figuras 3A-3H muestran la secuencia de
5 nucleótidos del plásmido pD17-20H4 9 h4a incluyendo la hebra
de codificación (SEQ ID NO 1) hebra complementaria (SEQ ID
NO 2) y secuencia de aminoácido (el péptido líder son
residuos de aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO 3 cadena pesada
en residuos de aminoácidos 20-467 de SEQ ID NO 3)
10 codificados por la hebra de codificación

Las Figuras 4A-4F muestran la secuencia de
nucleótidos del plásmido pD16puerta-20H4 9 LC que incluye la
hebra de codificación (SEQ ID NO 4) hebra complementaria
(SEQ ID NO 5) y secuencia de aminoácido (el péptido líder
15 son los residuos de aminoácidos 1-20 de SEQ ID NO 6 la
cadena ligera son los residuos de aminoácidos 21-236 de SEQ
ID NO 6) codificados por la hebra de codificación

La Figura 5 muestra esquemáticamente un constructo
de una secuencia parcial de cadena pesada 20H4 9

20 La Figura 6 muestra esquemáticamente un constructo
de una secuencia parcial de cadena ligera 20H4 9

Las Figuras 7A-7D muestran las secuencias de
nucleótidos y de aminoácidos de la construcción de cadena
pesada 20H4 9-IgG1 que incluye la hebra de codificación (SEQ
25 ID NO 7) hebra complementaria (SEQ ID NO 8) y secuencia de

aminoácidos (péptido líder es residuos de aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO 19 cadena pesada es residuos de aminoácido 20-470 de SEQ ID NO 9) que codifica por la hebra de codificación

Las Figuras 8A-8B ilustran los resultados obtenidos de la unión de mab 20H4 9-IgG1 a CD137L humano por ELISA (Figura 8A) y el efecto de mab 20H4 9-IgG1 sobre interacción de CD137-CD137L (Figura 8B)

Las Figuras 9A-9B ilustran los resultados obtenidos del enlace de mab 20H4 9-IgG1 con ionomicina PMA estimulada de humano o células de mono cinomolgus El CEM humano (FIG 10A) o PBMC de mono (FIG 10B) se incubaron con 20H4 9-IgG1 con proteínas de fusión CD137L humanas

Las figuras 10A-10B ilustran los resultados obtenidos por la inducción de IFN- γ en estudios co-estimuladores con anticuerpos anti-CD137 que se expresan con un incremento de pliegue en pg/ml sobre los controles Debido a la respuesta variable de respaldo entre los donadores se normalizaron los datos con relación a los tratamiento de controles (=1) El nivel de línea base IFN- γ de la mediana para la células T humanas (FIG 10A) o PBMC de mono (FIG 10B) que se estimula con anti-CD3 solamente fue de 592 pg/ml y 505 pg/ml respectivamente

La Figura 11 proporciona gráficas de resonancia de plasmón de enlace de mab 20H4 9-IgG4 y mab 20H4 9IgG1 al CD137 humano

La Figura 12 ilustra la concentración dependiente de unión de 20H4 9-IgG4 a ionomicina PMA estimulada a células CEM de humano pero no se une para desestimar células CEM

Las figuras 13A-13B ilustran la inducción de IFN γ en estudios co-estimuladores con anticuerpos anti-CD137. Los resultados se expresan como un incremento en veces en pg/ml sobre los controles. Debido a la respuesta variable de respaldo entre los donadores se normalizan los datos en relación a los tratamientos de control (=1). El nivel de línea base IFN- γ de la mediana para las células T humanas (FIG 13A) o PBMC o de mono (FIG 13B) que se estimula con el anti-CD3 solamente fue de 592 pg/ml y 505 pg/ml respectivamente.

Las figuras 14A-14B ilustran los resultados obtenidos para la mejora dependiente de la dosis de la síntesis de IFN- γ por mab 20H4 9-IgG4 (FIG 14A) y el efecto del reticulado del anticuerpo por la adición de un anticuerpo IgG antihumano de reticulado (7 μ g/ml) (FIG 14B).

La Figura 15 ilustra el efecto de mab 20H4 9-IgG4 en la supervivencia de células T y el avance del ciclo celular. Las células T humanas se co-estimularon con anti-CD3 (1 μ g/ml) $\pm$ mab 20H4 9-IgG4 a las concentraciones enlistadas. Seis días después del inicio de los ensayos se recolectaron las células y se tiñeron con Anexina-V y yoduro de propidio para determinar el número de células vivas (Anexina V/PI).

negativa) o la ciclina D2 conjugada con PE para detectar las células que forman ciclos. Los resultados representan la media ($\pm$ SD) de 4 lotes de mab 20H4 9 IgG4 probados en paralelo.

5 Las Figuras 16A-16D muestran en monos cinomologus la respuesta de IFN- específica a antígeno como se mide por ELISPOT después del tratamiento con una vacuna de ADN $\pm$ anticuerpos anti 4-IBB humano. Los animales se trataron con una vacuna de SIV gag (día 0 28 56 Figura 16A) vacuna de
10 SIV gag (día 0 28 56) y mab 20H4 9-IgG4 (día 12 15 y 19 Figura 16B) o una vacuna de SIV gag (día 0 28 56) y hu39E3 G4 (día 12 15 y 19 Figura 16C). Un grupo de los animales se dejó sin tratar (Figura 16D). A varios momentos después del tratamiento se recolectó sangre y las PBMC se
15 separaron y evaluaron para su capacidad para segregar IFN- en la presencia de estimulación para antígeno.

Descripción Detallada de la Invención

La invención se refiere a la preparación y caracterización de anticuerpos y fragmentos de unión a
20 antígeno de los mismos (incluyendo proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión antígeno en un anticuerpo de la invención) para el uso en el tratamiento de un enfermedad tal como cáncer enfermedad infecciosa enfermedad inflamatoria enfermedad inmunitaria. El cáncer
25 puede ser por ejemplo cáncer de próstata melanoma o cáncer

epitelial

Los anticuerpos son capaces de la union a H4-1BB y pueden presentar alta afinidad para H4-1BB y mejoran de forma efectiva las respuestas de células T En un aspecto el anticuerpo induce producción de IFN- γ en ensayos co-estimuladores pero no afecta la unión de H4-1BB a su correspondiente ligando H4-1BBL y no fija el complemento

Los anticuerpos de la invención se pueden producir por métodos bien conocidos en la técnica En un aspecto los anticuerpos se pueden producir por expresión en células transfectadas tal como células eucarióticas inmortalizadas tal como células de mieloma o hibridoma

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o junto con otros agentes terapéuticos tales como radioterapia (incluyendo radiación) terapia hormonal agentes citotóxicos vacunas y otros agentes inmunomoduladores tales como citocinas y modificadores de la respuesta biológica Estos compuestos son particularmente útiles en el tratamiento del cáncer y otros trastornos inmunes proliferativos

En un aspecto la invención proporciona el anticuerpo monoclonal (mab)20H4 9-IgG4 Las figuras 1 y 2 proporcionan mapas de plásmido de pD17-20H4 9h4a y pD16puerta-20H4 9 LC respectivamente que se pueden usar para producir mab 20H4 9-IgG4 FIG 3 (FIGS 3A-3H) que

proporciona la secuencia de nucleótidos del plásmido pD17-20H4 9 h4a incluyendo la hebra de codificación (SEQ ID NO 1) hebra complementaria (SEQ ID NO 2) y secuencia de aminoácidos (péptido líder son los residuos de aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO 3 cadena pesada son los residuos de aminoácidos 20-467 de SEQ ID NO 3) codificados por la hebra de codificación FIG 4 (FIGS 4A-4F) muestra la secuencia de nucleótido del plásmido pD16puerta-20H4 9L C que incluye la hebra de codificación (SEQ ID NO 4) hebra complementaria (SEQ ID NO 5) y secuencia de aminoácidos (péptido líder son los residuos de aminoácidos 1-20 de SEQ ID NO 6 cadena ligera son los residuos de aminoácidos 21-236 de SEQ ID NO 6) codificados por hebra de codificación

En otro aspecto la invención proporciona el anticuerpo monoclonal (mab) 20H4 9-IgG1 La Figura 5 muestra esquemáticamente una construcción de secuencia de cadena pesada de mab 20H4 9 IgG1 La Figura 6 muestra esquemáticamente una construcción de secuencia ligera de mab 20H4 9 tanto para mab 20H4 9-IgG4 y 20H4 9-IgG1 La Figura 7 proporciona la secuencia de nucleótidos (hebra de codificación (SEQ ID NO 7) y hebra complementaria (SEQ ID NO 8)) de la construcción de secuencia de cadena pesada de la Figura 5 y la secuencia de aminoácidos (el péptido guía es los residuos 1-19 de aminoácidos de SEQ ID NO 9 la cadena pesada es los residuos 20-470 de aminoácidos de SEQ ID NO 9)

codificada por la hebra de codificación La cadena ligera de mab 20 H4 9-IgG1 es la misma como la cadena ligera de mab 20H4 9-IgG4

La invención también abarca anticuerpos y porciones
5 de enlace de antígenos de los mismos con substituciones conservadoras de aminoácidos a partir de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada detalladas en SEQ ID NO 3 6 y 9 que no tiene substancialmente un efecto en el enlace de H4-1BB Las substituciones conservadoras incluyen
10 típicamente la substitución de un aminoácido por otro con características similares por ejemplo substituciones dentro de los siguientes grupos valina glicina glicina alanina valina isoleucina leucina ácido aspártico ácido glutámico asparagina glutamina serina treonina lisina
15 arginina y fenilalanina tirosina

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la invención comprenden típicamente además una secuencia de control de expresión ligada operativamente a la secuencia de codificación de polipéptido que incluyen
20 regiones promotoras heterólogas o asociadas naturalmente Preferiblemente las secuencias de control de la expresión serán sistemas promotores eucarióticos en vectores que pueden transformar o transfectar células hospedadoras eucarióticas pero también se pueden usar secuencias de control para
25 hospedadores procarióticos Una vez que se ha incorporado el

vector en el hospedador adecuado el hospedador se mantiene bajo condiciones adecuadas para una expresión de alto nivel de la secuencia de nucleótidos y como sea deseado la recolección y purificación de la cadena ligera variable
5 cadena pesada dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpo intacto fragmentos de enlace u otra forma de inmunoglobulina que pueda seguir (Ver S Beychok Cells of Immunoglobulin Synthesis Academic Press N Y (1979)) También se pueden producir anticuerpos de cadena sencilla o minicuerpos
10 (anticuerpos de cadena sencilla fusionados a uno o más dominios CH) al unir la secuencia de ácido nucleico que se codifica en las regiones VL y VH aquí descritas con ADN que codifica una ligadura de péptidos

Los hospedadores procarióticos tales como E coli y
15 tros microbios tales como levadura se pueden usar para expresar un anticuerpo de la invención Además de los microorganismos también se pueden usar cultivos de células de tejido de mamíferos para expresar y producir los anticuerpos de la invención Se pueden preferir células
20 eucarióticas debido a un número de líneas celulares hospedadoras adecuadas que pueden secretar inmunoglobulinas intactas y que se han desarrollado e incluyen por ejemplo las líneas celulares CHO (de ovario de hámster chino COS (línea de célula de fibroblastos del mono verde africano)
25 células HeLa líneas de células de mieloma e híbridoma Los

vectores de expresión para estas células de expresión tal como un promotor o enriquecedor y sitios de la información de procesamiento necesarios tales como sitios de enlace a ribosomas sitios del empalme ARN sitios de poliadenilación y secuencias de terminador transcripcional todas conocidas en la técnica

Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés (por ejemplo las secuencias codificadoras de cadena ligera y/o pesada y las secuencias de control de expresión) se pueden transferir en la célula hospedadora por métodos bien conocidos que varían dependiendo del tipo de hospedador celular Por ejemplo la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procarióticas mientras que el tratamiento con fosfato de calcio lipofección o la electroporación se pueden usar para otros hospedadores celulares (Ver por ejemplo T Maniatis et al Molecular Cloning A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press (1982))

Una vez que se expresan los anticuerpos sus dímeros cadenas ligera y pesada individuales u otras formas de inmunoglobulina se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos estándar en el arte tal como precipitación de sulfato de amonio columnas de afinidad cromatografía en columna electroforesis de gel y similares Las inmunoglobulinas substancialmente puras de al menos 90 a 95 % de homogeneidad se prefieren y 98 % hasta 99 % o más

homogeneidad son las más preferidas

Los anticuerpos de la invención son útiles para modular células T y respuestas inmunitarias mediadas por células. Los estados típicos de enfermedad adecuados para el tratamiento incluyen un cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y miastenia gravis.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo o porción de enlace al antígeno del mismo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se puede esterilizar por técnicas convencionales de esterilización bien conocidas. Las composiciones también pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas adecuadas tales como agentes amortiguadores y agentes de ajuste de pH, agentes de mejora de estabilidad tal como manitol y tween 80, agentes de ajuste de toxicidad y similares por ejemplo acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio o albúmina humana.

Los anticuerpos y composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente útiles para la administración parenteral incluyendo administración subcutánea.

intramuscular e intravenosa Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral pueden comprender una solución del anticuerpo disuelto en un portador aceptable de manera preferente un portador acuoso

5 Se pueden usar una variedad de portadores acuosos bien conocidos en la técnica por ejemplo agua agua amortiguada solución salina glicina y similares Estas soluciones son estériles y en general están libres de materia en partículas Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en la forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosis

La composición farmacéutica puede comprender además un agente adicional para tratamiento de una enfermedad En un aspecto la composición farmacéutica 15 incluye un agente para el tratamiento de un cáncer una enfermedad infecciosa enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria El anticuerpo de la invención se puede también co-administrar o administrar de manera separada con un agente adicional para el tratamiento de una enfermedad

20 Los anticuerpos de la invención se pueden usar con otros agentes para mejorar la respuesta inmunitaria a células cancerosas en un paciente En un aspecto el anticuerpo se usa en combinación con un agente inmunogénico tal como células cancerosas antígenos tumorales purificados 25 (incluyendo proteínas recombinantes péptidos y moléculas de

carbohidrato) o células transfectadas con genes que codifican para citocinas inmunoestimuladoras y antígenos de superficie celular. En otro aspecto, el anticuerpo se usa en combinación con una vacuna tal como por ejemplo una vacuna de célula de tumor, vacuna de ADN o vacuna de célula de tumor modificada con gen tal como vacuna de célula de tumor modificada con GM-CSF, una vacuna de péptido o una vacuna de células dendríticas cargada de antígeno.

Se han contemplado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores. En una de estas estrategias se prepara una vacuna usando células tumorales autólogas o alogénicas. Estas vacunas celulares se han mostrado que son más efectivas cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. El GM-CSF se ha mostrado que es un potente activador de la presentación de antígeno para vacunación de tumor (Dranoff et al. PNAS 90 3539-43 (1993); E. Jaffee et al. J Clin Oncol 19 145-56 (2001); R. Salvia et al. J Clin Oncol 21 624-30 (2003)).

El estudio de la expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en varios tumores han conducido a la definición de los llamados antígenos específicos de tumor (S. Rosenberg, Immunity 10 281-7 (1999)). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la cual surgen los tumores por

ejemplo los antígenos de melanocitos gp 100 los antígenos de MAGE Trp-2 Muchos de estos antígenos se pueden mostrar que son los objetivos de células T específicas de tumor encontradas en el hospedador Los anticuerpos de la invención se pueden usar en unión con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor a fin de amplificar y dirigir la respuesta inmunitaria a estos antígenos hacia una respuesta de Th1 Estas proteínas se ven normalmente por el sistema inmunitario como auto-antígenos y por lo tanto son toleradas

En un aspecto de la invención el anticuerpo se combina con un agente inmunomodulador que comprende un antígeno de SIV (como un modelo de vacuna de ADN de HIV) o un antígeno específico de próstata (PSA) o una vacuna de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el antígeno de SIV gag o antígeno específico de próstata (PSA) Las vacunas de PSA se describen en por ejemplo M Pavlenko et al Br J Cáncer 91(4) 688-94 (2004) J Wolchok et al Semin Oncol 30(5) 659-66 (2003) J Kim et al Clin Cancer Res 7 (3 Suppl) 882s-889s (2001) Las vacunas de SIV gag se describen en por ejemplo B Malkital et al J Gen Virol 85 (Pt 8) 2407-19 (2004) N Letvin et al J Virol 78 (14) 7490-7 (2004) S Mossman et al AIDS Res Hum Retroviruses 20 (4) 425-34 (2004) F Bertley et al J Immunol 172 (6) 3745-57 (2004) L

Patterson et al J Virol 78 (5) 2212-21 (2004) E
 O'Neill et al AIDS Res Hum Retroviruses 19 (10) 883-90
 (2003) Z Bu et al Virology 309 (2) 272-81 (2003)

El antígeno de tumor también puede incluir por
 5 ejemplo la proteína telomerasa que se requiere para la
 síntesis de telomerasas de cromosomas y que se expresa en más
 de 85% de los cánceres humanos y sólo en un número limitado
 de tejidos somáticos (N Kim et al Science 266 2011-2013
 (1994)) El antígeno de tumor también puede ser "neo-
 10 antígenos" expresados en células de cáncer debido a
 mutaciones somáticas que alteran la secuencia de la proteína
 crean proteínas de fusión entre dos secuencias no
 relacionadas o idiotipo de tumores de células B Otras
 vacunas de tumor pueden incluir las proteínas de los virus
 15 implicados en los cánceres humanos tal como el Virus de
 Papiloma Humano (HPV) Virus de Hepatitis (HBV y HCV) y
 Virus de Sarcoma de Herpes de Kaposi (KHSV) Otra forma de
 antígeno específico de tumor que se puede usar con un
 anticuerpo de la invención es proteínas de choque térmico
 20 purificadas (HSP) aisladas del tejido tumoral mismo Estas
 proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas
 de las células tumorales y estas HSP son altamente eficientes
 en la distribución a las células que presentan el antígeno
 para producir inmunidad tumoral (R Suot et al Science 269
 25 1585-1588 (1995) Y Tamura et al Science 278 117-120

(1997))

Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para mejorar la respuesta inmunitaria a vacunas a agentes virales tal como HIV o HCV. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para mejorar la respuesta inmunitaria a otros agentes inmunomoduladores y para producir una respuesta inmunitaria de memoria. Los ejemplos de estos agentes son citocinas tal como GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-12, ligando F13, ligando CD40, adyuvantes tal como CpG-oligodesoxinucleótido (ADN bacteriano) o anticuerpos a OK-40 o CTLA-4.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicación terapéutica, la composición farmacéutica se administra a un paciente que ya sufre de una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente o tratar la enfermedad. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la severidad del estado de la enfermedad y del paciente (incluyendo por ejemplo el estado general del sistema inmunitario propio del paciente) y se puede determinar por un experto en la técnica. En aplicaciones profilácticas, la composición farmacéutica se administra a un paciente que no está en el estado de enfermedad para mejorar la resistencia del paciente al

estado de enfermedad Esta cantidad se define que es una
"dosis profilácticamente efectiva" En este uso las
cantidades precisas dependen del estado de salud del paciente
(incluyendo por ejemplo el estado general del sistema
5 inmunitario propio del paciente) y se puede determinar por un
experto en la técnica En un aspecto el uso profiláctico es
para la prevención de la recurrencia del tumor

Ejemplos

Ejemplo 1 Generación de Anticuerpos

10 Materiales y Métodos

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos
para el receptor humano CD137 (4-1BB) se generaron en el
ratón HuMAb® (Medarex Inc Princeton New Jersey) Se
inmunizaron los ratones HuMAb cinco veces
15 intraperitonealmente (i p) y subcutáneamente (s c) con 25 µg
del dominio extracelular del CD 137 humano en RIBI adyuvante
(Ribi Immunochemical) Previo a la fusión se reforzaron l s
ratones intravenosamente (i v) con la misma cantidad de
antígeno Las células del bazo de los ratones inmunizados con
20 concentraciones adecuadas de anticuerpos para huCD137 se
fusionaron a las células de mieloma de ratón siguiendo l s
procedimientos estándar

El CD3 mab antihumano (clon HIT3a) equipos ELISA
para IFNγ humano y de mono equipos de perlas citométricas
25 (CBA) y todos los anticuerpos conjugados para la citometría

de flujo se adquirieron de BD Pharmingen (San Diego California) El IgG₁ humano y el IgG₁ de humano se adquirieron de Sigma-Aldrich (St Louis Missouri) Las células CEM (ATCC-CRL 2265) se adquirieron de ATCC Los
5 medios de cultivo (RPMI) y el suero de bovino fetal (FBS) se adquirieron de Mediatech Inc (Herndon Virginia) Las Alsevers de Sangre Roja de Ovejas se adquirieron de Colorado Suerum Co (Denver Colorado)

Separación por exclusión de hibridomas Detección
10 del enlace de huCD137 por ELISA Para identificar hibridomas que secretan anticuerpos CD137 antihumanos se recubrieron placas ELISA (Nunc MaxiSorp) con proteína de fusión de IgG_{2b} de ratón CD137 humanas a 1µg/ml en PBS durante la noche a 4°C Luego se lavaron 3 veces las placas con PBS con 0.01%
15 Tween-80 (PBS-T) y se bloquearon posteriormente con PBS-T más albúmina de suero de bovino al 1% (BSA) durante 20 minutos a temperatura ambiente Se agregaron cincuenta microlitros de sobrenadantes diluidos 1:3 en PBS-T a las placas y se incubaron 1-2 horas a temperatura ambiente Posteriormente
20 se lavaron las placas como antes y se detectó el enlace de los anticuerpos por una incubación con anticuerpo IgG antihumano F(ab)₂, de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Laboratorios West Grove Pennsylvania) Se desarrollaron las placas con pNPP y se leyeron a 405 nm

25 Ensayo de bloqueo Veintiséis hibridomas que

secretan anticuerpos que reconocen huCD137 por ELISA se evaluaron por su capacidad para permitir las interacciones CD137-CD137L. Estos análisis se efectuaron inicialmente en un formato ELISA. Se recubrieron las placas con CD137-muIgG_{2b} a 0.2 µg/ml 100/µl/pozo. Diluciones en serie del 20H4 9-IgG1 mab o anticuerpos de control diluidos en PBS-T y albúmina de suero de bovino al 1% se agregaron a la placa. Se agregó la proteína de fusión CD137L-CD8 a los pozos a una concentración de 0.2 µg/ml. Se detectó el enlace de los anticuerpos con un anticuerpo anti-CD8 biotinilado (0.2 µg/ml Ancell). Después de varias lavadas la fosfatasa alcalina con estreptavidina (1:2000) y pNPP para la detección de anticuerpos enlazados se agregaron y se leyeron las placas a 405 nm.

Para confirmar que los anticuerpos seleccionados no alteran el enlace CD137-CD137L se caracterizaron además anticuerpos purificados caracterizados por análisis BIAcore. Todos los experimentos se efectuaron en un instrumento BIAcore 3000 (BIAcore Inc Piscataway New Jersey). Se inmovilizó el CD137 humano covalentemente a alta densidad en una superficie de dextrano metilada con carboxi de una microplaqueta sensora BIAcore (BIAcore Inc Piscataway New Jersey). Se efectuaron inyecciones a 2 µg/mL en solución amortiguadora de acetato 10 mM pH 5.0. Los ésteres activos sin ocupar se bloquearon posteriormente por inyección de un exceso de etanolamina. Se hizo la regeneración de la

superficie con glicina 10mM pH 2.0

Se diluyeron muestras purificadas de anticuerpos anti-CD137 hasta concentraciones de hasta 200 y 1000 nM usando solución salina amortiguada HEPES pH 7.4 complementada con NaCl 0.15 M y tensioactivo de P20 al 0.005% (HBS-EP). Las proteínas de fusión humanas CD137L-CD8 (huCD137L) se utilizaron como una fuente del ligando CD137. Se efectuaron experimentos en los cuales se inyectó huCD137L previo a los anticuerpos anti-CD137 o viceversa. Se efectuaron inyecciones a una relación de flujo de 5µL/min. Se retiraron los anticuerpos y el ligando enlazado por regeneración con solución amortiguadora de glicerina 10 mM pH 2.0.

Purificación de células humanas T. Las células T o PBMCs se obtuvieron de donadores humanos saludables. Se recolectó la sangre en EDTA, se suspendió en una solución amortiguadora de elutriación (RPMI que contiene EDTA 2.5 mM, 10µg/ml polimixina B) se superpusieron con un medio de separación de Linfocito (LSM, Mediatech Inc, Herndon, Virginia) y se centrifuga a 1800 rpm por 25 minutos. Las interfaces celulares se recolectan y se centrifugan a 1500 rpm por 10 minutos. Posteriormente se vuelven a suspender los pelletizados celulares en una solución amortiguadora de elutriación y se lavan con células de glóbulos rojos de oveja (SRBC 1:10 dilución) y se incuban sobre hielo durante

una hora. Luego las células se ponen en subcapas con LSM y se centrifugan a 2500 rpm por 25 minutos. Se retiran las interfaces y se lisan los SRBC con solución amortiguadora de lisis SRBC. Se lavaron y se volvieron a suspender las células aisladas en T en 10% FBS/RPMI.

Análisis Citométrico de flujo El enlace de los anticuerpos CD137 antihumano a los CD137 expresados en células se determinó por citometría de flujo. Una línea celular de leucemia de células T humanas (CEM) o células monocíticas de sangre periférica de monos cinomolgus (PBMC) se usaron para estos estudios. Estas células no expresan CD137 constitutivamente pero se puede inducir el receptor por estimulación con miristato de forbol (PMA 10 ng/ml) e ionomicina (1µM) durante 18 horas. Luego se lavaron las células y se incubaron con diversas concentraciones de los anticuerpos en solución amortiguadora de tinción (solución salina amortiguada de fosfato PBS más FCS 1% y azida de sodio 0.01%). El enlace de los anticuerpos a las células estimuladas y no estimuladas se detectó por IgG antihumano de cabra conjugado por fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch West Grove Pennsylvania). Se fijaron las muestras en 1% de formalina, se mantuvieron a 4°C y se tomó una lectura por citometría de flujo.

Ensayos Funcionales Las células T primarias humanas o PBMC de mono obtenidas de donadores saludables se

estimularon con un anticuerpo anti-CD3 inmovilizado para suministrar la primer señal para la activación de células T y se co-estimularon con anticuerpos CD137 antihumano de humano Como un control no específico el anticuerpo anti-
5 carcinoma humanizado (BR96) se usó a la misma concentración de anticuerpos Se recubrieron las placas con anticuerpo anti-CD3 (0.5-1 µg/ml) a 4°C durante la noche Al día siguiente se colocaron células T o PBMC a concentraciones de $1-1.5 \times 10^5$ / pozo Se midió la síntesis de IFN-γ después de
10 72 horas de cultivo a 37°C ya sea por una configuración de perlas citométricas (CBA) o por ELISA

Ensayos de Citocina

ELISA Después de la estimulación de células T a diversos tiempos se centrifugaron las placas y se retiraron
15 los medios Los niveles de citocina se detectaron por un ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen San Diego California) En resumen las muestras de prueba y estándares se agregaron a placas de 96 pozos recubiertas con anti-citocina Después de la incubación por 2
20 horas a temperatura ambiente se lavaron las placas 3 veces en PBMS-T y luego se incubaron primero con un anticuerpo detector de trabajo seguido por adición del sustrato Se leyó la absorbancia de 405 nm y se calcularon las concentraciones en base con la curva estándar

25 Configuración de Perlas Citométricas Otro método

usado para determinar la producción de citocina in vitr fue la citometría de flujo usando una configuración de perlas citométrica (CBA) desarrollada por BD Pharmingen Se midieron los niveles de IFN- γ IL-2 IL-5 IL-4 IL-10 y TNF- en sobrenadantes de cultivo siguiendo las instrucciones del fabricante Se analizaron los resultados por citometría de flujo con un software de análisis CBA

Resultados

Los anticuerpos que secretan hibridomas que muestran enlaces al CD137 humano se expandieron y subclonaron adicionalmente Se purificaron los anticuerpos secretados y se probaron por su capacidad de enlazarse a huCD137 y permitir la interacción de CD137-CD137L Del panel de anticuerpos CD137 anti-humanos evaluados se seleccionó el mab 20H4 9-IgG1 con una evaluación adicional con base en su perfil de enlace y propiedades de no bloqueo El anticuerpo 20H4 9-IgG1 es IgG1 kappa como se determina por ELISA usando IgG1 Anti-humano de fosfatasa alcalina y reactivos kappa y lambda (Southern Biotech Birmingham Alabam) La figura 8 (FIG 8A enlace a humano CD137 por ELISA FIG 9B- efecto de mab 20H4 9-IgG1 sobre la interacción de CD137-CD137L) proporciona la caracterización inicial de mab 20H4 9-IgG1 Las diluciones en serie de mab 204 9-IgG1 26G6 (un anticuerpo de bloqueo) o toxoide de tétanos (TT control negativo) se evaluaron por su capacidad de alterar el enlace

de CD137 a CD137L Mab 20H4 9-IgG1 a concentraciones de hasta 10 µg/ml no bloquea el enlace de CD137L en tanto que mab 26G6 inhibe la unión a concentración > 0.37 µg/ml

Mab 20H4 9 IgG1 también se probó por su reactividad a CD137 expresado en células T humanas (CEM) y en células monocíticas de sangre periférica de mono cinomolgus (PBMC) estimuladas por PMA e ionomicina. Los estudios previos determinaron que el CD137 se sobrerregula en las células T después de la activación con PMA e ionomicina. Las moléculas de control consistieron de un anticuerpo IgG humano irrelevante (control negativo) de la proteína de fusión CD137L-CD8 (control positivo BD Pharmingen San Diego California). Los resultados de estos estudios indican que el mab 20H4 9-IgG1 se enlaza a los CEM y PBMCs humanos activados del mono cinomolgus con un enlace mínimo a células no estimuladas. Se detectaron porcentajes similares de células positivas en mab 20H4 9-IgG1 o CD137L. La figura 9 proporciona los resultados obtenidos del enlace de mab 20H4 9 IgG1 a las células del mono cinomolgus o humanas estimuladas con ionomicina-PMA. El CEM (FIG 9A) de humano PBMC (FIG 9B) de mono se incubaron con 20H4 9-IgG1 proteína de fusión CD137 humana. Se agregaron los anticuerpos secundarios y se leyeron las muestras por citometría de flujo.

A continuación se determinó si el mab 20H4 9-IgG1

puede inducir una mejora de IFN- γ en ensayos c -estimuladores en presencia de una estimulación anti-CD3 el efecto funcional deseado para un anticuerpo antagonista CD137 Mab 20H4 9-IgG1 se evaluó por su actividad co-estimuladora en estudios funcionales en linfocitos humanos y de mono Con base en los datos iniciales una concentración de 20 ug/ml de anticuerpo anti-CD137 (anticuerpo en exceso) se usó en estos estudios Los niveles de anticuerpos anti-CD3 entre 0.2-1 μ g/ml se probaron lo cual resultó en 10-20% de linfocitos positivos CD-137 Los niveles de IFN- γ en sobrenadantes se midieron después de 72 horas en cultivo Como se muestra en la figura 10 mab 20H4 9 IgG1 mostró una síntesis de IFN- γ en ensayos co-estimuladores de humano y de mono hasta niveles significativamente superiores que los controles Los resultados de los estudios efectuados con células T aislados de 8 donadores humanos saludables mostró que en seis de ellos mab 20H4 9-IgG1 mejoró la síntesis de IFN- γ en 2.2-4.3 veces en comparación con los controles Uno de los otros dos donadores mostró un incremento de 1.6 veces El nivel de mejora fue superior a aquellos observados con hu39E3 G4 un anticuerpo anti-CD137 humanizado suministrado en la solicitud PCT publicada WO04/010947 (que se incorpora aquí como referencia) lo cual muestra el aumento de IFN- γ en 5 de cada 8 donadores y a niveles inferiores de mab 20H4 9-IgG1 (incremento de 1.5 a 2 veces) (FIG 10A) En estudios c -

estimuladores con monos mab 20H4 9-IgG1 también demostró una actividad funcional mejorada lo que resulta en un aumento importante de IFN γ sobre los controles (FIG 10B) Como en los estudios de humanos la mejora de IFN- γ fue
5 consistentemente superior que con hu39E3 G4

Se observó también inducción de la síntesis de TNF-
arriba de los niveles de control en cultivos de humanos aunque en niveles mucho menores de IFN- γ Los niveles de TNF-
inducidos por el anticuerpo anti-CD3 solamente (línea base)
10 fueron alrededor de 20-50 veces menores que los niveles de línea base para IFN- γ Mab 20H4 9-IgG1 indujo un increment de ~2 a 4 7 veces en 3 de 8 donadores Nuevamente hu39E3 G4 (probado en paralelo) indujo un incremento de alrededor de 2 veces en los mismos donadores pero a niveles inferiores
15 Otras citocinas probadas IL-2 IL-5 IL-10 y IL-4 no cambiaron significativamente con ningún tratamiento

En conjunto estos estudios demostraron que mab 20H4 9-IgG1 presentó una actividad funcional deseada en humanos y en monos al inducir cualquier tipo de respuesta
20 Th1 Significativamente ya que la actividad anti-tumor in vivo se asocia con la capacidad de los anticuerpos anti-CD137 para inducir la síntesis de IFN- γ estos resultados apoyaron la selección de mab 20H4 9-IgG1 para un intercambio de isotipos

Ejemplo 2 Caracterización In Vitro de mab 20H4 9-IgG4

25 Con base en su cinética de enlace la incapacidad

de bloquear la interacción CD137-CD137L y los efectos funcionales en las células T humanas se seleccionó mab 20H4 9-IgG1 para cambiar a una forma de IgG4. La forma IgG4 de mab 20H4 9-IgG1 es 20-H4 9-IgG4 (detallada en las Figuras 3 y 4)

5 La segunda fase de estos estudios involucró la comparación de las propiedades *in vitro* de mab 20H4 9-IgG4 y mab 20H4 9-IgG1. En esta sección las propiedades cinéticas de enlace y los efectos funcionales de ambos anticuerpos en linfocitos humanos y de mono se describen

10 Cinética de Enlace

Las propiedades cinéticas de los anticuerpos anti-humanos CD137 se evaluaron por resonancia de plasmón de una superficie usando un instrumento BIAcore 3000. El antígeno IgG₂ de murino CD137 humano se inmovilizó covalentemente a una baja densidad en la superficie de la microplaqueta sensora CM5. Se inyectaron mab 20H4 9-IgG4 y mab 20H4 9 IgG1 a concentraciones de entre 25 y 200 nM. La figura 11 detalla inyecciones a 100 nM de mab 20H4 9-IgG1 y mab 20H4 9-IgG4. Los datos calculados usando un software BIA evaluación (modelo bivalente análisis de ajuste de curvas globales) resultó en los parámetros cinéticos que fueron similares a ambos anticuerpos (ver tabla 1). Las constantes de disociación K_d para mab 20H4 9-IgG1 y mab 20H4 9-IgG4 se determinaron como 11.2 y 16.6 nM respectivamente. Baj

25 condiciones experimentales similares mab 20H4 9-IgG4 no se

uni6 a murina 4-IBB

Tabla 1

Comparaci6n de la cin6tica de enlace de mab 20H4 9-IgG4 y mab 20H4 9-IgG1

5

Anticuerp o	K_{a1} (1/MS)	K_{d1} (1/s)	K_{a2} (1/RUs)	K_{d2} (1/s)	R_{max} (RU)	K_{d1}	K_{d1} (nM)
20 h4 9 IgG1	3 43E+04	3 85E+0 4	2 30E 05	1 51E 03	262	8 91E+07	11 22
20 h4 9	3 92E+04	6 51E	0 0755	0 105	409	6 02E+07	16 61

10

An6lisis citom6tricos de flujo

15

El mab 20H4 9-IgG4 biotinilado a concentraci nes que varían de 0 32 ng/ml a 5 µg/ml se prob6 para la uni6n a células CEM ± PMA-yonomicina El mab se uni6 a células 20H4 9-IgG4 a células CEM estimuladas con PMA-yonomicina de una manera dependiente de la dosis Se logr6 saturaci6n a 0 2 µg/ml Por otra parte como se muestra para su mol6cula de origen el mab 20H4 9-IgG1 el mab 20H4 9-IgG4 no se uni6 a células CEM que no se estimularon con PMA-yonomicina (Figura 12) La uni6n dependiente de la concentraci6n de mab 20H4 9-IgG4 se demostr6 en células CEM estimuladas con PMA-yonomicina (Figura 12) Las muestras se leyeron por citometría de flujo

20

25

Ensayos funcionales/celulares

Para confirmar que el proceso del intercambio del isotipo de mab 20H4 9-IgG1 no alter6 la actividad del anticuerpo se efectuaron estudios in vitro para comparar la

actividad del mab 20H4 9-IgG4 con el mab 20H4 9-IgG1 precursor en PBMC de mono y células T humanas. Los efectos funcionales de mab 20H4 9-IgG4 en las células T humanas y de mono o PBMC se determinaron y compararon con su molécula precursora mab 20H4 9-IgG1. Las células T humanas primarias o PBMC de mono obtenidas de donadores saludables se estimularon con el anticuerpo anti-CD3 (0.5 µg/ml-1 µg/ml) +/- anticuerpos CD137 anti-humanos. Se midió la síntesis de IFN-γ después de 72 horas de cultivo a 37°C por una configuración de perlas citométricas (CBA) para muestras humanas o por ELISA para muestras de mono. Se probaron anticuerpos en ensayos co-estimuladores en presencia de concentraciones sub-óptimas de anticuerpo anti-CD3 (1 µg/ml) o Concavalina A (1 µg/ml) (solamente donadores M5170 y 81). Se expresaron los resultados como un incremento en veces en pg/ml con los controles. Debido a la respuesta de respaldo variable entre los donadores se normalizaron los datos con relación a los tratamientos de control (=1). La figura 13A proporciona los resultados humanos de células T y la FIG 13B proporciona los resultados de mono PBMC. Como se muestra en las FIGS 13A-13B mab 20H4 9-IgG4 demostró las propiedades co-estimuladoras que producen niveles superiores de IFN-γ en células humanas y de mono en comparación con los controles. El nivel de enriquecimiento de la síntesis de IFN-γ fue comparable con su molécula precursora en muestras de mono y de humano.

Posteriormente el efecto de reticulado de anticuerpo sobre el efecto funcional de mab 20H4 9-IgG4 se evaluó. Se ha demostrado que el reticulado de anticuerpos puede resultar en la potenciación de su capacidad de señalización. Así se efectuó un estudio para determinar la actividad funcional de diversos lotes de mab 20H4 9-IgG4 $\pm$ un anticuerpo IgG anti-humano. Como se muestra en FIG 14A una mejora importante de la síntesis de IFN- γ se observó para todos los lotes probados en ausencia de anticuerpos de reticulado con un asentamiento a concentraciones de 400 ng/ml. El aumento de la síntesis de IFN- γ por mab 20H4 9-IgG4 se mejoró además por la adición de un anticuerpo de reticulado anti-humano IgG como se muestra en la FIG 14B. Lotes diferentes de mab 20H4 9-IgG4 tuvieron actividades celulares comparables.

Así el reticulado de mab 20H4 9-IgG4 resultó en una mejora de la capacidad del anticuerpo en inducir la síntesis de IFN- γ . El reticulado de anticuerpo in vivo puede suceder por los receptores celulares para la porción Fc de inmunoglobulina o por la dimerización de anticuerpo. Mab 20H4 9-IgG4 es del isotipo IgG4 el cual cuando se compara con otros isotipos IgG tiene una baja afinidad para los receptores Fc. Sin embargo el IgG4 se puede enlazar a Fc γ RI (CD64) expresado sobre monocitos y neutrófilos.

Se utilizaron otros dos planteamientos para caracterizar además a mab 20H4 9-IgG4 (i) efecto en la supervivencia de las células T y (ii) efecto en la expresión

de la ciclina D2 Para determinar si el mab 20H4 9-IgG4 puede
obtener una señalización a través de CD137 en las células T
humanas y suministrar señales co-estimuladoras a la células T
que conducen a la supervivencia y expansión celular las
5 células T humanas estimuladas con anticuerpos anti-CD3 +/-
mab 20H4 9-IgG4 a concentraciones que se saben que inducen la
síntesis de IFN- γ se tiñeron con anexina V y yoduro de
propidio para determinar el número de células vivas (Anexina
V/yoduro de propidio negativo) y con ciclina D2 para
10 determinar su efecto en el avance celular La figura 15
muestra los resultados promedio de 4 lotes diferentes de mab
20H4 9-IgG4 en la expresión de la ciclina D2 y la
supervivencia de células T Las concentraciones de mab
20H4 9-IgG4 de 0.4-10 μ g/ml resultaron en un incremento en el
15 número de células vivas por aproximadamente 1.8-2 veces y
produjeron un incremento importante en el número de células
T que expresan la ciclina D2 (2.5-3 veces)

Ejemplo 3 Evaluación in vivo de anticuerpos 4-1BB en un
modelo farmacodinámico en monos cinomolgus

20 Este ejemplo ilustra la capacidad de mab 20H4 9-
IgG4 y mab hu39E3 G4 para mejorar la respuesta inmunitaria
específica a antígeno producida por vacuna de ADN

Materiales y Métodos

25 Grupos de animales experimentales monos cinomolgus
(hembras y machos (2.5 a 5.0 kg) se compraron de Charles

River BRF (Houston Texas) para este estudio y se alojaron en pares. Cada grupo experimental consiste de 4 macho y 2 hembras que se aleatorizaron en grupos por peso corporal. Los grupos experimentales fueron como sigue:

5 Grupo 1- Vacuna de SIV y ADN de PSA (2 mg cada una) día 0 28 56 i m más control con solución salina i v en días 12 15 y 19

 Grupo 2- vacuna de SIV gag y ADN de PSA (2 mg cada una) día 0 28 56 i m más mab hu39E 3G4 i v en días 12 15 y 19

10 Grupo 3- vacuna de SIV y ADN de PSA (2 mg cada una) día 0 28 56 i m más mab 20H4 9-IgG4 i v en días 12 15 y 19

 Grupo 4 grupo de control sin tratar

 Las inmunizaciones y tratamientos con anticuerpos. Las vacunas de ADN de PSA y SIV gag se obtuvieron de David B. Weiner Department of Pathology and Laboratory of Medicine University of Pennsylvania (Ver Kim et al. Oncogene 20: 4497-4506 (2001); Muthumani et al. Vaccine 21: 629-637 (2003)).

20 Los monos se inmunizaron por ruta intramuscular con construcciones de ADN tanto de PSA como de SIV gag (2 mg/construcción/inmunización) simultáneamente seguido por dos refuerzos 4 semanas después (días 0 28 y 56). Doce días después de la inmunización inicial se inició el tratamiento con mab 20H4 9-IgG4 o mab hu39E3 G4. Los anticuerpos se administraron i v a 50 mg/kg en los días 12 15 y 19.

25 después de la primera inmunización. Este programa se eligió

debido a que se mostró que suprime la respuesta de anticuerpo al mab hu39E3 G4

Patología Clínica

De principio a fin del transcurso del estudio se
5 llevaron a cabo exámenes físicos en todos los monos por 1 s
veterinarios que los atienden Se recolectaron muestras
sanguíneas para hepatología y química sérica antes de las
vacunaciones y en los días 12 42 70 97 134 y 168 después
de las inmunizaciones

10 Ensayos inmunológicos

Para determinar el efecto en las respuestas
inmunitarias inducidas por estos regimenes terapéuticos se
usó un ensayo de punto inmunitario enlazado a enzima
(ELISPOT) para la detección de la producción de IFN- por
15 linfocitos estimulados específicos del antígeno Se
recolectaron muestras sanguíneas para análisis de ELISPOT
antes de las vacunaciones y en los días 12 42 70 97 134 y
168 después de las inmunizaciones Los péptidos sintéticos
corresponden a las secuencias completas del antígeno de SIV y
20 PSA se usaron para la estimulación ex vivo de PBMC

Resultados

Las células que segregan IFN- específicas de
antígenos en respuesta en los péptidos de PSA o SIV se
cuantificaron por ELISPOT La Figura 16 (Figuras 16A-16D)
25 ilustran los resultados obtenidos para Grupos 1-4

respectivamente El nivel de respuesta a PSA fue muy bajo en todos los grupos indicando que la vacuna por sí misma no induce una respuesta inmunitaria medible y consistente en comparación a animales no vacunados Por otra parte la
5 vacunación con SIV gag sola dio por resultado un número significativo de células que segregan IFN- específicas de antígeno que aumentaron durante el tiempo (Figura 16A) Los animales no tratados (no vacunados) mostraron 100-1 000 puntos/ 10^6 PBMC de principio a fin del transcurso del estudio
10 (Figura 16D) Estos resultados establecieron la respuesta de umbral a la vacuna los animales que presentaron < 1 000 puntos/ 10^6 PBMC se consideraron como que no respondieron En el grupo de animales que recibieron la vacuna 5 de los 6 monos mostraron una respuesta incrementada durante el tiempo
15 con un número medio de puntos después de la tercera inmunización (día 70) e 1 727 puntos/ 10^6 PBMC (SD = 242 rango = 1 403-1 968 puntos/ 10^6 PBMC) Un mono se consideró como que no respondió (620 puntos/millón de PBMC) Puesto que en estos estudios no se hizo la tipificación de MHC es
20 probable que la carencia de respuesta de células T a la vacuna por algunos monos pueda ser debida a la mala correspondencia con MHC De forma notable en el día 70 4 de los 6 animales tratados con SIV gag*plus mab 20H4 9-IgG4 presentaron un número significativamente mayor de puntos de
25 IFN- (Figura 16C) en comparación a los animales de control

(Figura 16D) y a los macacos que se inmunizaron con vacuna de ADN sola (Figura 16A). El número medio de puntos después de la tercera inmunización para el grupo tratado con mab 20H4 9-IgG4 fue 3 465 puntos/ 10^6 PBMC (SD = 1 236 intervalo = 2 070-4 780 puntos/ 10^6 PBMC). Dos monos en ese grupo no respondieron a la vacuna (< 800 puntos/millón de PBMC). Después de la tercera inmunización (día 70) el tratamiento con vacuna de mab hu39E3 G4 plus ADN dio por resultado 6 de los 6 animales considerados como respondedores con un número medio de puntos/ 10^6 PBMC de 2 348 (SD = 588 intervalo = 1 738-3 283) (Figura 16B). Para este grupo el intervalo del número de puntos fue menor en comparación a aquellos macacos tratados con mab 20H4 9-IgG4.

El tratamiento tanto con mab 20H4 9-IgG4 y mab hu39E3 G4 fue bien tolerado y no dio por resultado ningún cambio significativo en los signos clínicos, química clínica o parámetros hematológicos con relación a los monos de control.

Estos datos muestran que el tratamiento con mab 20H4 9-IgG4 en combinación con una vacuna de ADN produjo una mejora in vivo de la magnitud de la respuesta celular específica al antígeno de prueba con relación a los controles o el tratamiento con mab hu39E3 G4 como se mide por células que segregan IFN específicas del antígeno. Puesto que sólo un nivel de dosis de los anticuerpos y un régimen de

dosificación se usaron en estos estudios preliminares es improbable que se indujeran respuestas máximas y se requiere trabajo adicional para optimizar las condiciones Sin embargo de forma clara aún con este protocolo no optimizado se logró una mejora de la respuesta celular a antígenos de prueba con mab 20H4 9-IgG4 sugiriendo que la modulación de la función de CD137 puede ser un planteamiento atractivo para aumentar la efectividad de las vacunas de ADN

Aunque se ha descrito la invención en algún detalle de manera de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad y entendimiento será evidente que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de la reivindicaciones anexas

Se hace constar que con relación a esta fecha el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la presente invención es el que resulta claro a partir de la presente descripción de la invención

20

25

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes
5 reivindicaciones

1 Anticuerpo monoclonal o porción de enlace a antígeno del mismo que se enlaza específicamente a 4-1BB que comprende una región variable de cadena ligera y una
10 región variable de cadena pesada caracterizado porque

la región variable de cadena ligera comprende un CDR1 un CDR2 y un CDR3 como se detalla en la figura 4 y

la región variable de cadena pesada comprende un CDR1 un CDR2 y un CDR3 como se detalla en la figura
15 3

2 Anticuerpo monoclonal o porción de enlace a antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 1 caracterizado porque

la cadena ligera comprende una región variable como se detalla en la figura 4 y
20

la cadena pesada comprende una región variable como se detalla en la figura 3

3 Anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera y una cadena pesada caracterizado porque la cadena
25 ligera comprende los residuos de aminoácidos 21-236 de SEQ ID

NO 6 y la cadena pesada comprende los residuos de aminoácidos 20-467 de SEQ ID NO 3

4 Composición farmacéutica caracterizada porque comprende

5 el anticuerpo monoclonal o porción de enlace a antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable

5 Composición farmacéutica caracterizada porque comprende

10 el anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 3 y

un portador farmacéuticamente aceptable

6 Método para el tratamiento del cáncer de un sujeto caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo monoclonal o porción de enlace a antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 1 al sujeto

7 Polinucleótido aislado caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 20-467 de SEQ ID NO 3

8 Polinucleótido de conformidad con la reivindicación 7 caracterizado porque comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 1

25 9 Polinucleótido aislado caracterizado porque

comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la
secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 21-
236 de SEQ ID NO 6

10 Polinucleótido de conformidad con la
5 reivindicación 9 caracterizado porque comprende la secuencia
de nucleótidos de SEQ ID NO 4

10

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

Anticuerpos completamente humanos y porciones de
enlace de antígenos de los mismos que se enlazan al 4-1BB
humano y que permiten el enlace del 4-1BB humano al ligando
5 4-1BB humano En un aspecto el anticuerpo es el anticuerpo
IgG4 También se suministra un método para el tratamiento del
cáncer en un sujeto que comprende administrar una cantidad
terapéuticamente efectiva del anticuerpo al sujeto

10

15

20

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Jure-Kunkel Maria
Befta Laura
Santoro Marc
Ganguly Subinay

<120> ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA 4 IEB HUMANO

<130> 10060 PCT

<150> US 60/510193

<151> 2003-10-10

<150> aún no asignado

<151> 2004-10-08

<160> 9

<170> PatentIn version 3 2

<210> 1

<211> 7057

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia artificial

<400> 1

cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc	60
aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt	120
aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta	180
tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg actatttacg	240
gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cdcctattga	300
cgtcaatgac ggtaaatggc cgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt	360
tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg	420
gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttcaa gtctccaccc	480
cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggaacttc caaatgtcg	540
taacaactcc gccocattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat	600
aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggettatcg aaattaatac	660
gactcactat agggagaccc aagcttggta ccgccatgaa acacctgtgg ttcttcctcc	720
tcctgggtggc agctcccaga tgggtcctgt ccaggtgca actacagcag tggggcgag	780
gactgttgaa gccttcggag accctgtccc tcacctgcgc tgtctatggt gggtcottca	840
gtggttacta ctggagctgg atacgccagt cccagagaa ggggctggag tggattgggg	900

aaatcaatca tgggtggatac gtcacctaca atccgtccct cgagagtcga gtcaccatat 960
 cagtagacac gtccaagaac cagttctccc tgaagctgag ctctgtgacc gccgcggaca 1020
 cggctgtata ttactgtgcg agggactatg gtcoggggaa ttatgactgg tacttcgatac 1080
 tctggggccg tggcaccctg gtcactgtct cctcagctag caccaagggc ccatccgtct 1140
 tccccctggc gccctgtcc aggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggtgcctgg 1200
 tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctacggcgcc ctgaccagcg 1260
 gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgctg 1320
 tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacagc 1380
 ccagcaaac caaggtggac aagagagttg agtccaaata tggtcacct tgccacctt 1440
 gccagcacc tgagttcctg gggggaccat cagtcttcct gttccoccca aaacccaagg 1500
 acactctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg 1560
 aagacccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaga 1620
 caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc 1680
 tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aaaggcctcc 1740
 cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt 1800
 acaccctgcc cccatccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg 1860
 tcaaggctt ctacccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga 1920
 acaactacaa gaccacgct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca 1980
 ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc 2040
 atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtaaatgat 2100
 ctagagggcc ctattctata gtgtcaccta aatgctagag ctctgtgatc agcctcgact 2160
 gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgccctccc ccgtgccttc cttgaccctg 2220
 gaaggtgcca ctccactgt ctttccctaa taaatgagg aaattgcac gcattgtctg 2280
 agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg 2340
 gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga ggcggaaga 2400
 accagctggg gctctagggg gtatccccc gcgccctgta gcggcgatt aagcgcgcg 2460
 ggtgtggtgg ttacggcgag cgtgaccgt acacttgcca gcgccctagc gccgctcct 2520
 ttgcctttct tcccttctt tctcgccagc ttgcggggc ctctcaaaa agggaaaaa 2580
 agcatgcac tcattagtc agcaaccata gtccgcccc taactccgc catccgccc 2640

ctaaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat 2700
gcagaggccg aggccgcctc ggootctgag ctattccaga agtagtgagg aggccttttt 2760
ggaggcctag gcttttgcaa aaagcttgga cagctcaggg ctgcgatttc gcgccaaact 2820
tgacggcaat cctagcgtga aggctggtag gattttatcc ccgctgccat catggttcga 2880
ccattgaact gcatcgtcgc cgtgtccca aatattggga ttggcaagaa cggagacct 2940
ccctggcctc cgctcaggaa cgagttcaag tacttccaaa gaatgaccac aacctcttca 3000
gtggaaggta aacagaatct ggtgattatg ggtaggaaaa cctggttctc cattcctgag 3060
aagaatcgac ctttaaagga cagaattaat atagttctca gtagagaact caaagaacca 3120
ccacgaggag ctcatTTTTt tgccaaaagt ttggatgatg ccttaagact tattgaacaa 3180
ccggaattgg caagtaaagt agacatgggt tggatagtcg gaggcagttc tgtttaccag 3240
gaagccatga atcaaccagg ccaccttaga ctctttgtga caaggatcat gcaggaattt 3300
gaaagtgaca cgtttttccc agaatgtgat ttggggaaat ataaacttct cccagdatac 3360
ccaggcgtcc tctctgaggt ccaggaggaa aaaggcatca agtataagtt tgaagtctac 3420
gagaagaag actaacagga agatgctttc aagttctctg ctccctcct aaagotatgc 3480
atTTTTataa gaccatggga cttttgtgg ctttagatct ctttgtgaag gaaccttact 3540
tctgtggtgt gacataattg gacaaactac ctacagagat ttaaagctct aaggtaaata 3600
taaaattttt aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttgt gtattttaga 3660
ttccaacct tgyaactgat gaatgggagc agtgggtgaa tgcctttaat gaggaanacc 3720
tgttttgctc agaagaaatg scatctagtg atgatgaggc tactgctgac tctcaacatt 3780
ctactcctcc aaaaagagag agahaggtag aagacccca ggactttcct tcagaattgc 3840
taagtTTTTt gagtcagtct gtgtttagta atagaactct tgcttgcttt gotatttaca 3900
ccacaaagga aaaagctgca ctgctataca agaaattat ggaaaaatat tctgtaacct 3960
ttataagtag gcataacagt tataatcata acatactgtt ttttcttact ccacacaggc 4020
atagagtgtc tgctattaat aactatgctc aaaaattgtg tacctttagc tttttaattt 4080
gtaaaggggt taataaggaa tatttgatgt atagtgcctt gactagagat cataatcagc 4140
cataccacat ttgtagaggt ttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac 4200
ctgaacata aatgaatgc aattgttgtt gttacttgt ttattgcagc ttataatggt 4260
tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag catttttttc actgcattct 4320
agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggatcgg ctggatgatc 4380
ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttgcccacc ccaacttgtt tattgcagct 4440

tataatggtt	acaaataaag	caatagcatc	acaaatttca	caaataaagc	atTTTTTTca	4500
ctgcattcta	gttgtggttt	gtccaaactc	atcaatgtat	cttatcatgt	ctgtataaccg	4560
tcgacctcta	gctagagctt	ggcgtaatca	tggctatagc	tgtttcctgt	gtgaaattgt	4620
tatccgctca	caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggt	4680
gcctaattgag	tgagetaact	cacattaatt	gogttgcgct	cactgccgcg	tttccagtcg	4740
ggaaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	atcgccaac	gogcggggag	aggcggtttg	4800
cgtattgggc	gtcttccgc	ttctcgctc	actgactcgc	tgcgctcgg	cgttcggctg	4860
cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacgg	tatccacaga	atcaggggat	4920
aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	4980
gcgttgctgg	cgtttttcca	taggtccgc	ccccctgacg	agcatcaca	aatcgacgc	5040
tcaagtcaga	ggtggogaaa	cccgacagga	ctataaagat	accaggcgtt	tccccctgga	5100
agctccctcg	tgcgtctctc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	5160
ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcaa	tgtcaccgct	gtaggtatct	cagttcggtg	5220
taggtcgttc	gtccaaagct	ggcgtgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	5280
gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtc	aaccoggtaa	gacacgactt	atcgccactg	5340
gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggoggtgc	tacagagttc	5400
ttgaagtgg	ggcctaacta	cggtacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	5460
ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	5520
gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	5580
caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaaoga	aaactcacgt	5640
taagggattt	tggtoatgag	attatcaaaa	aggatcttoa	cctagatoot	tttaattaa	5700
aatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggctctga	cagttaccna	5760
tgtttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcac	catagttgcc	5820
tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	ccccagtgc	5880
gcaatgatac	cgcgagacco	acgctcaccg	gtccagatt	tateagcaat	aaaccagcca	5940
gccggaaggg	cagagcgag	aagtggctct	gcaactttat	ccgcctccat	ccagtctatt	6000
aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	togccagtta	atagtttgcg	caacgittgt	6060
gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcagcg	tcgtcgtttg	gtatggcttc	attcagctcc	6120
ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	tgtgcaaaaa	agcggtttag	6180

```

tccttcgggc ctcogacgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttacc actcatgggt 6240
atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 6300
ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 6360
ccggcgctcaa tacgggataa tacogcgcca catagcagaa ctttanaagt gctcatcatt 6420
ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 6480
atgtaaccca ctogtgcacc caactgatct tcagcatott ttactttcac cagcgtttct 6540
gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 6600
tggtgaatac tcatactott cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 6660
ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaatagg ggttcgcgcg 6720
acatttcccc gaaaagtgc acctgacgtc gacggatccg gagatctgct aggtgacctg 6780
aggcgcgccg gcttcgaata gccagagtaa cttttttttt taattttatt ttattttatt 6840
tttgagatgg agtttggcgc cgtctccccg atccctatg gtcgactctc agtacaatct 6900
gctctgatgc cgcatagtta agccagtacc tgcctccctg ttgtgtgttg gaggtcgcg 6960
agtagtgccg gagcaaaatt taagctacaa caaggcaagg cttgaccgac aattgcatga 7020
agaatctgct tagggtagg cgttttgccg tgcctcg 7057

```

```

<210> 2
<211> 7057
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> secuencia artificial

```

```

<400> 2
gctacatgcc cggctctatat gcgcaactgt aactaataac tgatcaataa ttatcattag 60
ttaatgcccc agtaatcaag tatcgggtat atacctcaag gcgcaatgta ttgaatgcca 120
tttaccgggc ggaccgactg gggggttgcg gggggggggg aactgcagtt attactgcat 180
acaaggggat cattgcggtt atccctgaaa ggtaactgca gttaccaccg tgataaatgc 240
catttgacgg gtgaaccgtc atgtagtcca catagtatac ggttcatgog ggggataact 300
gcagttactg ccatctaccg ggcggaccgt aatcgggtc atgtactgga atacctgaa 360
aggatgaacc gtcattgtaga tgcataatca gtagcgataa tggtaaccact acgcaaaac 420
cgtcatgtag ttaccgcac ctatcgccaa actgagtgcc cctaaagggt cagaggtggg 480
gtaactgcag ttacctcaa acaaaacogt ggtttttagtt gccctgaaag gttttacagc 540
attgttgagg cggggtaact gggtttaccg gccatccgca datgccacc tccagatata 600

```

ttcgtctcga gagaccgatt gatctcttgg gtgacgmatg accgaatagc ttttaattatg 660
 ctgagtata tocctctggy ttogaacdat ggcggtactt tgtggacacc aagaaggagg 720
 aggaccaccg togaggggtct acccaggaca ggggccacgt tgatgtcgtc accccgcgtc 780
 ctgacaactt cgggaagcctc tgggacaggy agtggacgcy acagatacca cccaggaagt 840
 caccaatgat gacctcgacc tatgcggtca ggggtctctt ccccgacctc acctaacccc 900
 tttagttagt accacctatg cagtggatgt taggcaggga gctctcagct cagtggata 960
 gtcatctgtg caggttcttg gtcaagaggy acttcgactc gagacactgg cggcgctgt 1020
 gccgacatat aatgacacgc tcctgatac caggccctt aatactgacc atgaagctag 1080
 agaccccggc accgtgggac cagtgcaga ggagtcgatc gtggttcccg ggtaggcaga 1140
 agggggaccg cgggacaggy tcctcgtgga ggctctcgtg tcggcgggac ccgacggacc 1200
 agttcctgat gaaggggctt ggcactgcc acagcacctt gagtcgcggy gactggtcgc 1260
 cgcacgtgtg gaagggccga caggatgtca ggagtcctga gatgaggag togtcgcacc 1320
 actggcacgg gaggtcgtcg aaccctgct tctggatgtg gacgttgcat ctagtgttcg 1380
 ggtcgttgtg gttccacctg ttctctaac tcaggttat accaggtgga acgggtgga 1440
 cgggtcgtgg actcaaggac cccctggtg gtcagaagga caaggggggt tttgggttcc 1500
 tgtgagagta ctagagggcc tgggactcc agtgcaocyca ccaccacctg cactcgggtcc 1560
 ttctggggct ccaggtcag ttgacctgc acctacgca cctccacgta ttacggttct 1620
 gtttcggcgc cctcctcgtc aagttgtcgt gcatggcaca ccagtcgcag gaggggcagg 1680
 acgtggctct gaccgacttg ccgttctca tgttcaogtt ccagagggtg tttcggagg 1740
 gcaggaggtg gctcttttgg tagaggttcc ggtttccgt cggggctctc ggtgtocaca 1800
 tgtgggacgg ggttagggtc ctctctact ggttcttgg ccagtcggac tggacggacc 1860
 agtttcgaa gatggggtcg ctgtagggc acctaccct ctcgttacc gtcggcctct 1920
 tgttgatgtt ctgggtcgga gggcacgacc tgaggctgcc gaggaagaag gagatgtcgt 1980
 ccgattggca cctgttctcg tccacctcc tcccttaca gaaggtacg aggcactacg 2040
 tactccgaga cgtgttgggt atgtgtgtct tctcggagag ggacagagac ccatttacta 2100
 gatctccgg gataagatat cacagtggat ttacgatctc gagcgactag tcggagctga 2160
 cacggaagat caacggtcgg tagacaacaa acggggaggg ggcacggaag gaactgggac 2220
 cttccacggt gagggtgaca ggaaggatt attttactcc tttacgtag cgtaacagac 2280
 tcatccacag taagataaga cccccaccc cccccgtcc tgcgttccc cctcctaacc 2340

cttctgttat cgtccgtacg acccctacgc cacccgagat accgaagact ccgcctttct 2400
 tggtcgaccc cgagatcccc cataggggtg cgcgggacat cgccgcgtaa ttgcgcgcgc 2460
 ccacaccacc aatgcgcgtc gcactggcga tgtgaacggt cgcgggatcg cgggcgagga 2520
 aagcgaanga agggaaggaa agagcgggtc aagcggcccg gagagttttt toctttttt 2580
 tcgtacgtag agttaatcag tcgttggtat cagggcgggg attgaggcgg gtagggcggg 2640
 gattgaggcg ggtcaaggcg ggttaagggc ggggtaccga ctgattaaa aaaataaata 2700
 cgtctccggc tccggcggag cgggagactc gataaggctc tcatcactcc tccgaaaaa 2760
 cctccggatc cgaaaacgtt tttcgaacct gtcgagtccc gacgctaaag cgcggtttga 2820
 actgcogtta ggatcgcact tccgaccatc ctaaaatagg ggcgacggtg gtaccaagct 2880
 ggtaacttga cgtagcagcg gcacagggtt ttatacccoo aaccgttctt gcctctggat 2940
 gggaccggag gcgagtccct gctcaagttc atgaaggttt ctactcgtg ttggagaagt 3000
 caccttccat ttgtcttaga ccactaatac ccactccttt ggaccaagag gtaaggactc 3060
 ttotttagctg gaaatttcoo gtcttaatta tatcaagagt catctcttga gtttcttgg 3120
 ggtgctcctc gagtaaaaga acggttttca aacctactac ggaattctga ataacttgtt 3180
 ggccttaacc gttcatttca tctgtaccna acctatcagc ctccgtcaag acaaatggc 3240
 cttcgggtact tagttggtcc ggtggaatct gagaacact gttcctagta cgtccttaa 3300
 ctttactgtg gcaaaaaggg tctttaacta aaccccttta tatttgaaga gggctttatg 3360
 ggtccgcagg agagactcca ggtcctcctt ttcccgtagt tcatattcaa acttcagatg 3420
 ctcttctttc tgattgtcct tctacgaaag ttcaagagac gaggggagga tttcgtacg 3480
 taaaatatt ctggtabcct gaaaacgacc gaaatctaga gaaacacttc cttggaatga 3540
 agacaccaca ctgtattaac ctgtttgatg gatgtctcta aatttcgaga ttccatttat 3600
 attttaaaa ttccatattt acacaatttg atgactaaga ttaacaaaca cataaatct 3660
 aaggttggat accttgacta cttaccctcg taccacctt acggaatta ctccttttgg 3720
 acaaacgag tcttctttac ggtagatcac tactactcog atgacgactg agagtgtaa 3780
 gatgaggagg tttttcttc tctttccatc ttctggggtt cctgaaagga agtcttaacg 3840
 attcaaaaa ctcagtacga cacaatcat tatcttgaga acgaacgaaa cgataaatgt 3900
 ggtgtttcct ttttcgactg gacgatatgt tcttttaata cttttttata agacattgga 3960
 aatattcatc cgtattgtca atattagtat tgtatgacaa aaagaatga ggtgtgtccg 4020
 tatctcacag acgataatta ttgatacgag tttttaacac atggaaatcg aaaaattaaa 4080
 catttcccca attattcctt ataaactaca tatcacgga ctgatctcta gtattagtcg 4140

gtatggtgta aacatctoca aatgaacga aatTTTTTgg aggggtgtgga gggggacttg 4200
gactttgtat ttacttacg ttaacaacaa caattgaaca aataacgtcg aatattacca 4260
atgtttattt cgttatcgta gtgtttaaag tgtttatttc gtaaaaaaag tgacgtaaga 4320
tcaacaccaa acaggtttga gtagttacat agaatagtac agacctagcc gacctactag 4380
gaggtcgcgc ccctagagta cgacctcaag aagcgggtgg ggttgaaaca ataacgtcga 4440
atattaccaa tgtttatttc gttatcgtag tgtttaaagt gtttatttcg taaaaaagt 4500
gacgtaagat caacacacaa caggtttgag tagttacata gaatagtaca gacatatggc 4560
agctggagat cgtatctgaa cgcattagt accagtatcg acaaggaca cactttasca 4620
atagycgagt gttaaggtgt gttgtatgct cggccttcgt atttcacatt tcggacccca 4680
cggattactc actcgattga gtgtaattaa cgcaacgca gtgacgggcg aaaggtcagc 4740
cctttggaca gcacggtcga cgtaattact tagccggttg cgcgccctc tccgccaaac 4800
gcataacccg cgagaaggcg aaggagcgag tgactgagcg acgagagcca gcaagccgac 4860
gccgctcgcc atagtcgagt gaggttccgc cattatgcca atagggtgtct tagtccccta 4920
ttgcgtcctt tcttgtaac tcgttttccg gtcgttttcc ggtccttggc atttttccgg 4980
cgcaacgacc gcaaaaagg atccgagggc gggggactgc tcgtagtgtt tttagctgcg 5040
agttcagtct ccacgcctt gggctgtcct gatatttcta tggtcgcaa agggggacct 5100
tcgagggagc acgcgagagg acaaggctgg gacggcgaat ggcctatgga caggcgga 5160
gagggaaacc ctccgcaccg cgaagaggtt acgagtgcga catccataga gtcaagccac 5220
atccagcaag cgaggttcga ccgcacacac gtgcttgggg ggcaagtogg gctggcgagc 5280
cggaataggc cattgatagc agaactcagg ttgggccatt ctgtgctgaa tagcgtgac 5340
cgtcgtcggg gaccattgtc ctaatcgtct cgtccatc atccgccacg atgtctcaag 5400
aacttcacca cgggattgat gccgatgtga tcttcctgtc ataaaccata gacgcgagac 5460
gacttcggtc aatggaagcc tttttctcaa ccatcgagaa ctaggccgtt tgtttggtgg 5520
cgaccatcgc caccaaaaa acaaacgttc gtcgtcta atgcgtcttt ttttcctaga 5580
gttcttctag gaaactagaa aagatgcccc agactgcgag tcaccttgct tttgagtgc 5640
attccctaaa accagtactc taatagtttt tcctagaagt ggatctagga aaatttaatt 5700
tttacttcaa aatttagtta gatttcatat atactcattt gaaccagact gtcaatgggt 5760
acgaattagt cactcgtgg atagagtcgc tagacagata aagcaagtag gtatcaacgg 5820
actgaggggc agcacatcta ttgatgctat gccctocga atggtagacc ggggtcacga 5880

cgttactatg gcgctctggg tgcgagtggc cgaggtctaa atagtcgtta tttggtcggg 5940
 cggccttccc ggctcgcgtc ttcaccagga cgttgaata ggcggaggta ggtcagataa 6000
 ttaacaacgg cccttogatc tcattcatca agcgggtcaat tatcaaacgc gttgcaacaa 6060
 cggtaacgat gtccgtagca ccacagtgcg agcagcaaac cataccgaag taagtcgagg 6120
 ccaaggggtg ctagtccgc tcaatgtact aggggggtaca acacgttttt tcgccaatcg 6180
 aggaagccag gaggctagca acagtcttca ttcaaccggc gtcacaatag tgagtaccaa 6240
 taccgtcgtg acgtattaag agaattgacag tacggtaggc attctacga aagacactga 6300
 ccactcatga gttggttcag taagactctt atcacatacg ccgctggctc aacgagaacg 6360
 ggcgcgagtt atgocctatt atggcgcggg gtatcgtctt gaaattttca cgagtagtaa 6420
 ccttttgcaa gaagccccgc ttttgagagt tcctagaatg ggcacaactc taggtcaagc 6480
 tacattgggt gagcacgtgg gttgactaga agtcgtagaa aatgaaagtg gtcgcaaaga 6540
 cccactcgtt tttgtccttc cgttttaacg cgttttttcc cttattcccg ctgtgccttt 6600
 acaacttatg agtatgagaa ggaaaaagtt ataataactt cgtaatagtt cccmataaca 6660
 gagtactcgc ctatgtataa acttacataa atctttttat ttgtttatcc ccaaggcgcg 6720
 tgtaaagggg cttttcacgg tggactgcag ctgctagcc ctctagacga tccactggac 6780
 tccgcgcggc cgaagcttat cggctctatt ggaaaaaaa attaaataa aataaataa 6840
 aaactctacc tcaaacgcgg gctagagggc taggggatac cagctgagag tcatgttaga 6900
 cgagactacg gcgtatcaat tcggtcatag acgagggacg aacacacaac ctccagcgac 6960
 tcatcacgcg ctcgttttta attcgatggt gttccgttcc gaactggctg ttaapgtact 7020
 tcttagadga attccaatcc gcaaaacgcg acgaagc 7057

<210> 3
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

<400> 3

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

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30

+30
137

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

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

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

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

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

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

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

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

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

134
138

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
275 280 285

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Gly Lys
465

<210> 4
<211> 6435
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia artificial

<400> 4

gaaggatcgg gagatctgct agcccggtg acctgaggcg cgcggcttc gaatagccag	60
agtaaccttt tttttaatt ttattttatt ttatttttga gatggagttt ggcgccgato	120
tccgatccc ctatggtcga ctctcagtac aatctgctct gatgcgcgat agttaagcca	180
gtatctgctc cctgcttgty tgttgagggt cgctgagtag tgcgcgagca aaatttaagc	240
tacaacaagg caaggcttga ccgacaattg catgaagaat ctgcttaggg ttaggcgttt	300
tgcgctgctt cgcgatgtac gggccagata tacgcgttga cattgattat tgactagtta	360
ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagcca tatatggagt tccgcgttac	420
ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc	480
aataatgacg tatgttcca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt	540
ggagtattta cggtaaatg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac	600
gccccctatt gaogtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgcc agtacatgac	660
cttatgggac tttctactt ggcagtacat ctaogtatta gtcatogcta ttaccatggt	720
gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggag tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc	780
aagtctccac ccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaatc aacgggactt	840
tccaaatgt cgtacaact cgcgccatt gacgcaatg ggcggtaggc gtgtacggtg	900
ggaggcttat ataagcagag ctctctggt aactagagaa cccactgctt actggcttat	960
cgaattaat acgactcact ataggagac ccaagcttat caacaagttt gtacaaaaa	1020
gcaggctggt accatggaag cccagctca gcttctctc ctctgctac tctggctcdc	1080
agataccacc ggagaaattg tgttgacaca gtctccagcc accctgtctt tgtctccagg	1140
ggaagagacc accctctct gcagggccag tcagagtgtt agcagctact tagcctggtt	1200
ccaacagaaa cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca acagggccac	1260
tggcatccca gccaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag	1320
cagcctagag cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagcgtagca actggcctcc	1380
ggcgtcact ttccgaggag ggaccaaggt ggagatcaaa cgtacggtgg ctgcaccatc	1440
tgtcttcact tcccgccat ctgatgagca gttgaatct ggaactgcct ctgttgtgtg	1500
cctgtgaat aacttotatc ccagagaggg caagtacag tggagggtgg ataacgcoct	1560
ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag	1620
cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg	1680

cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca ggggagagtg 1740
 ttagacccag ctttcttgta caaagtgggt gatctagagg gccctattct atagtgtcac 1800
 ctaaagtcta gagctcgtg atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt 1860
 gtttgccct ccccggtgcc ttcttgacc ctggaaggtg ccactccac tgcctttcc 1920
 taataaatg aggaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat tctgggggt 1980
 ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat 2040
 gcggtgggt ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagct ggggtcttag ggggtatccc 2100
 caogcgccct gtagcggcgc attaacgcgc ggggtgttg tggtaacgc cagcgtgacc 2160
 gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttccctc ctttctcgcc 2220
 acgttcggcg ggcctctcaa aaaaggaaa aaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc 2280
 atagtccgc ccctaactcc gccatcccg cccctaactc cgccagttc cgccattct 2340
 ccgccccatg gctgactaat ttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctggcctct 2400
 gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt ttggaggcc taggcttttg caaaaagctt 2460
 ggggggacag ctgagggtg cgatttcgcg ccaaactga cggcaatcct agcgtgaagg 2520
 ctggtaggat tttatcccg ctgccatcat ggttcgacca ttgaactgca tcgtcgccgt 2580
 gtcccaaat atggggattg gcaagaacgg agacctacc tggcctccgc tcaggaacga 2640
 gttcaagtac ttccaagaa tgaccacaac ctcttcagt gaaggtaaac agaactctgt 2700
 gattatgggt aggaanaact ggttctccat tctgagaag aatcgacct taaaggacag 2760
 aattaatata gttctcagta gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc 2820
 cdaaggttg gatgatgct taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaagtaga 2880
 catggttttg atagtggag gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca 2940
 cctcagactc ttgtgacaa ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttccaga 3000
 aattgatttg gggaaatata aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca 3060
 ggaggaaaaa ggcataagt ataagtttg agtctacgag aagaagact aacaggaa 3120
 tgctttcaag ttctctgct cctcctaaa gctatgcatt tttataagac catgggaact 3180
 ttgctggct tagatctgat ctttgtgaag gaaccttact tctgtggtgt gacataattg 3240
 gacaaactac ctacagagat ttaaagctct aaggtaaata taaaattttt aagtgtataa 3300
 tgtgttaaac tactgattct aattgtttgt gtattttaga ttccaacctt tggaaactgat 3360
 gaatgggagc agtggtgga tgcctttaat gaggaacc tgttttgctc agaagaaatg 3420
 ccatctagt atgataggc tactgctgac tctcaacatt ctactcctcc aaaaagaag 3480

agaaaggtag aagaccccaa ggactttcct tcagaattgc taagtttttt gagtcattgct 3540
gtgttttagta atagaactct tgcttgcttt gctatttaca ccacaaagga aaaagctgca 3600
ctgctatata agaaaattat ggaaaaatat tctgtaacct ttataagtag gcataacagt 3660
tataatcata acatactgtt ttttcttact ccacacaggc atagagtgtc tgctattaat 3720
aactatgctc aaaaattgtg taccttttagc tttttaattt gtaaaggggt taataaggaa 3780
tatttgatgt atagtgcctt gactagagat cgatcataat cagccatacc acatttgtag 3840
aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctccccct gaacctgaaa cataaatga 3900
atgcaattgt tgttgtaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaa taaagcaata 3960
gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttactgca ttctagttgt ggtttgtcca 4020
aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga toggctggat gatcctccag cgcggggatc 4080
tcattgctga gttcttcgcc caccocaaact tgtttattgo agcttataat ggttacaaat 4140
aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat totagttgtg 4200
gtttgtceaa actcatcaat gtatcttatc atgtctgtat accgtcgacc tctagctaga 4260
gottggogta atcatggta tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc 4320
cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttagct 4380
aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc cgcctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc 4440
agctgcatta atgaatggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt 4500
ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag 4560
ctcactcaa ggcggtata cggttatcca cagaatcagg ggaatacga ggaagaaca 4620
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt 4680
tccataggct cggccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc 4740
gaaacccgac aggaactata agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctctgctgct 4800
ctcctgttcc gaacctgccg cttaaccgat acctgtccgc ctttctccct togggaagcg 4860
tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca 4920
agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggttaact 4980
atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 5040
acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta 5100
actacggcta cactagaagg aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc 5160
ttcggaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgtggt 5220

```

ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 5280
atctttttcta cgggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc 5340
atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa 5400
tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag 5460
gcacctatct cagogatctg totatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctctg 5520
tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga 5580
gaccacgcgt caccgggtcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag 5640
cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tocatccagt ctattaattg ttgccgggaa 5700
gctagagtaa gtagttcgcc agttaantag ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacggc 5760
atcgtgggtg cacgctcgtc gtttggatat gcttcattca gctccggttc ocaacgatca 5820
aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaazaagcgg ttagctcctt cggctcctccg 5880
atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat 5940
aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc 6000
aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg 6060
gataatacgg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg 6120
gggcgaaaac totcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 6180
gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 6240
ggaaggcaaa atgccgcasa aaaggggaata agggcgacac ggaatgttg aatactcata 6300
ctcttctctt ttaaatatta ttgaagcatt tatcaggggt attgtctcat gagcggatac 6360
atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tcccogaaaa 6420
gtgccacctg acgtc 6435

```

```

<210> 5
<211> 6435
<212> ADW
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> secuencia artificial

```

```

<400> 5
ctgcctagcc ctctagacga tcgggcccac tggactccgc gggccgaag cttatcggtc 60
tcattggaaa aaaaaattaa aataaaataa aataaaaact ctacctcaa ccgcggctag 120
agggctaggg gataccagct gagagtcatg ttagacgaga ctacggcgta tcaattcggc 180
catagacgag ggacgaacac acmacctcca gcgactcatc acgcgctcgt tttaaattcg 240

```

atgttggtcc	gttccgaact	ggctgttaac	gtacttctta	gacgaatccc	aatccgcaaa	300
acgcgacgaa	gcgtacatg	cccgtctat	atgcgcaact	gtaactaata	actgatcaat	360
aattatcatt	agttaatgcc	ccagtaatca	agtatcgggt	atatacctca	agggcgcaatg	420
tattgaatgc	catttacggg	gcccaccgac	tggcgggttg	ctggggcgcg	gtaactgcag	480
ttattactgc	atacaagggt	atcattgcgg	ttatccctga	aaggtaactg	cagttaccca	540
cctcataaat	gccatttgac	gggtgaaccg	tcattgtagt	cacatagtat	acggttcattg	600
cgggggataa	ctgcagttac	tgccatttac	cgggcggacc	gtaatacggg	tcattgtactg	660
gaataccctg	aaaggatgaa	ccgtcatgta	gatgcataat	cagtagcgat	aatggtagcca	720
ctacgccaaa	accgtcatgt	agttaccgcg	acctatcgcc	aaactgagtg	cccctaagg	780
ttcagagggtg	gggtaactgc	agttaccctc	aaacaaaacc	gtgggttttag	ttgcctgaa	840
aggttttaca	gcattgttga	ggcggggtaa	ctgcgtttac	ccgccatccg	cacatgccac	900
cctccagata	tattcgtctc	gagagaccga	ttgatctctt	gggtgacgaa	tgaccgaata	960
gctttaatta	tgttgagtga	tatccctctg	ggttcgaata	gttggtcaaa	catgtttttt	1020
cgcccgacca	tgttaccttc	gggttcgagt	cgaagagaag	gaggacgatg	agaccgagg	1080
tctatggtgg	cctctttaac	acaactgtgt	cagaggtcgg	tgggacagaa	acagaggctc	1140
cctttctcgg	tgggagagga	cgtcccggtc	agtctcaca	tcgtcgatga	atcggaccat	1200
ggttgtcttt	ggaccggctc	gagggtccga	ggagtagata	ctacgtagg	tgtcccggtg	1260
accgtagggt	cgggtccaagt	caccgtcacc	cagaccctgt	ctgaagtgag	agtggtagtc	1320
gtcggatctc	ggacttctaa	aadgtcaaat	aatgacagt	gtcgcattcgt	tgaccggagg	1380
ccgcgagtga	aagccgcctc	cctgggttcca	cctctagttt	gcattgccacc	gacgtggtag	1440
acagaagtag	aagggcggtg	gactactcgt	caactttaga	ccttgacgga	gacaacacac	1500
ggacgactta	ttgaagatag	ggtctctccg	gtttcatgtc	accttccacc	tattgcggga	1560
ggtagccca	ttgagggtcc	tctcacagt	tctcgtcctg	tcgttcctgt	cgtggatgtc	1620
ggagtcgtcg	tgggactgcg	actcgtttcg	tctgatgtc	tttgtgtttc	agatgoggac	1680
gcttcagtg	gtagtcccg	actcgagcgg	gcagtgtttc	tcgaagtgt	cccctctcac	1740
aatctgggtc	gaaagaacat	gtttcaccaa	ctagatctcc	cgggataaga	tatcacagt	1800
gatttacgat	ctcgagcgac	tagtcggagc	tgacacggaa	gatcaacggt	cggtagacaa	1860
caaacgggga	gggggcacgg	aaggaaactg	gaccttcac	ggtgagggtg	acaggaaagg	1920
attattttac	tcctttaacg	tagcgttaaca	gactcatcca	cagtaagata	agaccccca	1980

```

ccccaccccg tcctgtcgtt cccctccta acccttctgt tatcgtccgt acgaccccta 2040
cgccacccga gataccgaag actccgcctt tottggtcga ccccgagatc ccccataggg 2100
gtgcgcggga catcgcgcgc taattcgcgc cgcacacacc accaatgcgc gtgcactgg 2160
cgatgtgaac ggtcgcggga tcgcgggcga ggaagcgaa agaagggaag gaaagagcgg 2220
tgcaagcggc cgggagagtt ttttcccttt ttttcgtacg tagagttaat cagtcgttgg 2280
tatcagggcg gggattgagg cgggtagggc ggggattgag gcggtcaag gcggttaaga 2340
ggcgggtac cgactgatta aaaaaataa atacgtctcc ggctccggcg gagccggaga 2400
ctcgataagg tcttcacac tcctccgaaa aaacctccgg atccgaaaac gtttttcgaa 2460
ccccctgtc gagtcccgac gctaaagcgc ggtttgaact gccgttagga tcgcacttcc 2520
gaccatccta aaataggggc gacggtagta ccaagctggg aacttgacgt agcagcggca 2580
cagggtttta taccctaac cgttcttgcc tctggatggg accggaggcg agtccttgct 2640
caagttcatg aaggtttctt actggtgttg gagaagtcac cttccatttg tcttagacca 2700
ctaataccca tccttttga ccaagaggta aggactcttc ttagctggaa atttcctgtc 2760
ttaattatat caagagtcac ctcttgagtt tcttggtggt gctcctogag taaaagaacg 2820
gttttcnaac ctactacgga attctgaata acttggtggc cttaccggtt catttcacat 2880
gtaccaaac tatcagctc cgtcaagaca aatggtcctt cggtagtag ttggtccggt 2940
ggagtctgag aaacactggt ctagtagct ccttaaaact tcaactgtga aaaaggtct 3000
ttaactnaac ccttttatat ttgaagaggg tcttatgggt ccgcaggaga gactccagg 3060
cctccttttt cgttagttca tattcaact tcagatgctc ttctttctga ttgtccttct 3120
acgaagttc aagagacgag gggaggttt cgtacgtaa aaatattctg gtaccctgaa 3180
aacgaccga atctagacta gaaacacttc cttggaatga agacaccaca ctgtattaac 3240
ctgtttgatg gatgtctcta aatttcgaga ttccatttat attttaaaaa ttcacatatt 3300
acacaatttg atgactaaga ttaacaaaca cataaantct aaggttggat accttgacta 3360
cttaccctcg tcaccacctt acggaatta ctcttttgg acaaaacgag tcttctttac 3420
ggtagatcac tactactccg atgacgactg agagttgtaa gatgaggagg ttttttcttc 3480
tctttccatc ttctgggggt cctgaaagga agtccttaacg attcdaaaaa ctcagtacga 3540
cacaaatcat tatcttgaga acgaacgaaa cgataaatgt ggtgtttcct ttttcgacgt 3600
gacgatatgt tcttttaata cctttttata agacattgga aatattcatc cgtattgtca 3660
atattagtat tgtatgacaa aaaagaatga ggtgtgtccg tatctcacag acgataatta 3720
ttgatagcag tttttaacac atggaatcg aaanttaa catttcccca attattcctt 3780

```

ataaactaca tatcacggaa ctgatctcta gctagtatta gtccgtatgg tgtaaaccatc 3840
 tocaaaatga acgaattttt ttggagggtg tggaggggga cttggacttt gtattttact 3900
 tacgttaaca acaacaattg aacaantaac gtcgaatatt accaatgttt atttcgttat 3960
 cgtagtgttt aaagtgttta tttcgtaaaa aaagtgacgt aagatcaaca ccaaacaggt 4020
 ttgagtagtt acatagaata gtacagacct agccgacctc ctaggagggtc gcgcccctag 4080
 agtacgacct caagaagcgg gtgggggttg acaataacg tcgaatatta ccaatgttta 4140
 tttcgttata gtagtgttta aagtgtttat ttogtaaaaa aagtgaagta agatcaaacac 4200
 caaacagggt tgagtagtta catagaatag tacagacata tggcagctgg agatcgatct 4260
 cgaaccgcat tagtaccagt atcgacaaag gacacacttt aacaataggc gagtgttaag 4320
 gtgtgttgta tgctcggcct tcgtatttca ctttcggac ccacaggatt actcactcga 4380
 ttgagtgtaa ttaacgcaac gcgagtgaag ggcgaagggt cagccctttg gacagcacgg 4440
 tcgacgtaat tacttagccg gttgcgcgcc cctctcggcc aaacgcataa ccgcgcgaga 4500
 ggcgaaggag cgagtgaact agcgacgcca gccagcaagc cgacgcgcgt cgccatagtc 4560
 gagtgaagtt ccgccattat gccaatagg gtcttagtcc cctattgctt cctttcttgt 4620
 aactcgtttt tccggtcgtt ttccggtcct tggcattttt ccggcgcaac gaccgcaaaa 4680
 aggtatccga ggcgggggga ctgctcgtag tgttttttagc tgogagttca gtctccaccg 4740
 ctttgggctg toctgatatt tctatggtcc gcaaggggg accttcgagg gagcacgga 4800
 gaggacaagg ctgggacggc gaatggccta tggacaggcg gaaagaggga agcccttcgc 4860
 accgcgaagg agtatcgagt gcgacatcca tagagtcaag ccacatccag caagcgagggt 4920
 tcgaccgcac acacgtgctt ggggggcaag tggggctggc gacgcggant aggcattga 4980
 tagcagaact caggttgggc cattctgtgc tgaatagcgg tgaccgtcgt cggtgaccat 5040
 tgtcctaata gtctcgtcc atacatccgc cagatgtct caagaacttc accaccgat 5100
 tgatgcgat gtgatcttcc ttgtcataaa ccatagacgc gagacgactt cggtcattgg 5160
 aagccttttt ctcaaccatc gagaactagg ccgtttgttt ggtggcgacc atcgccacca 5220
 aaaaaacaaa cgttcgtcgt ctaatgcgcg tctttttttc cttaggttct tctaggaac 5280
 tagaaaagat gcccagact gcgagtcacc ttgcttttga gtgcaattcc ctaaaaccag 5340
 tactctaata gtttttccta gaagtggatc taggaaaatt taatttttac ttcaaaattt 5400
 agttagattt catatatact catttgaacc agactgtcaa tggttacgaa ttagtcactc 5460
 cgtggataga gtgcctagac agataaagca agtaggtatc aacggactga ggggcagcac 5520

```

atctattgat gctatgccct cccgaatggg agacgggggt cagcagctta ctatggcgct 5580
ctgggtgcga gtggccgagg tctaaatagt cgttatttgg tcggtcggcc ttcccggctc 5640
gcgtcttcac caggacgttg aataggcgg aggtaggcca gataattaac aacggccctt 5700
cgatctcatt catcaagcgg tcaattatca aacgcgttgc aacaacggta acgatgtccg 5760
tagcaccaca gtgcgagcag caaaccatac cgaagtaagt cgaggccaag ggttgctagt 5820
tccgctcaat gtactagggg gtacaacacg ttttttcgcc atcgaggaa gccaggaggc 5880
tagcaacagt cttcattcaa cgggcgtcac aatagtgagt accaataccg tcgtgacgta 5940
ttaagagaat gacagtacgg taggcattot acgaaaagac actgaccact catgagttgg 6000
ttcagtaaga ctcttatcac atacgccgct ggctcaacga gaacggggccg cagttatgcc 6060
ctattatggc gcggtgtatc gtcttgaant ttccacgagt agtaaccttt tgcaagaagc 6120
cccgtttttg agagttccta gaatggcgac aactctaggt caagctacat tgggtgagca 6180
cgtgggttga ctagaagtgc tagaaatga aagtggcgc aaagaccac tcgtttttgt 6240
ccttcogttt tacggcgttt tttcccttat tcccgtgtg cttttacaac ttatgagtat 6300
gagaaggaaa aagttataat aacttogtaa atagtccca taacagagta ctgcctatg 6360
tataaactta cataaatctt tttatttgtt tatccccaag gcgcgtgtaa aggggctttt 6420
cacggtggac tgcag 6435

```

```

<210> 6
<211> 236
<212> PRT
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> secuencia artificial

```

```

<400> 6

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

148
147 |

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
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 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Pro Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 7
<211> 1413
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia artificial

<400> 7
atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtccag 60
gtgcaactac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagacctt gtccctcacc 120
tgcgtgtct atggtgggtc ottcagtggt tactactgga gctggatacg ccagtcacca 180

gagaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcatggtg gatacgtcac ctacmatccg 240
 tccctcgaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
 ctgagctctg tgacogccgc ggacacggct gtatatctact gtgcgagggg ctatgggtccg 360
 gggaaattatg actggtaactt cgatctctgg ggccgtggca ccctggtcac tgtctectca 420
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg 480
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 540
 tggaaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 600
 ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
 tacatctgca acgtgaatca caagccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720
 aaatcttctg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 780
 ccgtcagttt tctcttccc cccaaaaccc aaggacccc tcatgatctc ccggaccct 840
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cagcaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc ogcgggagga gcagtacaac 960
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1080
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccac ccgggatgag 1140
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacac 1200
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagcgc gagaacaaact acaagaccac gcctcccgtg 1260
 ctggactccg acggtcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggaca gagcaggtgg 1320
 cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgatgagg ctctgdaca ccactacacg 1380
 cagaaagacc tctccctgtc ccgggtaaa tga 1413

<210> 8
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

<400> 8
 taotttgtgg acaccaagaa ggaggaggac caccgtcgag ggtctacca ggacagggtc 60
 cactttgatg tcgtcaoccc gcgtcctgac aacttcggaa gcctctggga caggaggtgg 120
 acgcgacaga taacaccag gaagtcacca atgatgacct cgacctatgc ggtcaggggt 180
 ctcttccccc acctcaccta accccttag ttagtaccac ctatgcagtg gatgttaggc 240

150
1491

```

agggagctct cagctcagtg gtatagtcac ctgtgcaggt tcttgggtcaa gagggacttc 300
gactcgagac actggcgccg cctgtgccga catataatga cacgctccct gataccaggc 360
cccttaatac tgaccatgaa gctagagacc ccggcaccgt gggaccagtg acagaggagt 420
cggagggtggt tcccggttag ccagaagggg gaccgtggga ggaggttctc gtggagaccc 480
ccgtgtcgcc gggacccgac ggaccagttc ctgatgaag ggcttggcca ctgccacagc 540
accttgagtc cgcgggactg gtccggcac gtgtggaagg gccgacagga tgtcaggagt 600
cctgagatga gggagtcgtc gcaccactgg cacgggaggt cgtcgaacc gtgggtcttg 660
atgtagacgt tgcacttagt gttcgggtcg ttgtggttcc acctgttctc tcaactcggg 720
tttagaacac tgttttgagt gtgtacgggt ggcacgggtc gtggacttga ggacccccct 780
ggcagtcaga aggagaaggg gggttttggg ttctgtggg agtactagag ggccctggga 840
ctccagtgtc cgcaccacca cctgcactcg gtgttcttg gactccagtt caagttgacc 900
atgcacctgc cgcacctcca cgtattacgg ttctgttctg gcgccctcct cgtcatgttg 960
tcgtgcatgg cacaccagtc gcaggagtgg caggacgtgg toctgaccga cttaccgttc 1020
ctcatgttca cgttccagag gttgtttcgg gagggtcggg ggtagctctt ttggtagagg 1080
tttcggtttc cgtogggggc tcttgggtgc cacatgtggg acgggggtag ggccctactc 1140
gactggttct tggccagtc ggactggacg gaccagttc cgaagatagg gtcgctgtag 1200
cggcacctca cctctcgtt acccgtcggc ctcttgttga tgttctggtg cggagggcac 1260
gacctgaggo tgccgaggaa gaaggagatg tcgttcgagt ggcacctgtt ctcgtccacc 1320
gtcgtccctc tgcagaagag tacyaggcac tacgtactcc gagacgtgtt ggtgatgtgc 1380
gtcttctcgg agagggacag gggccattt act 1413

```

<210> 9
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

<400> 9

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

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30

151
150 1

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

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

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

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

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

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

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

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

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

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

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

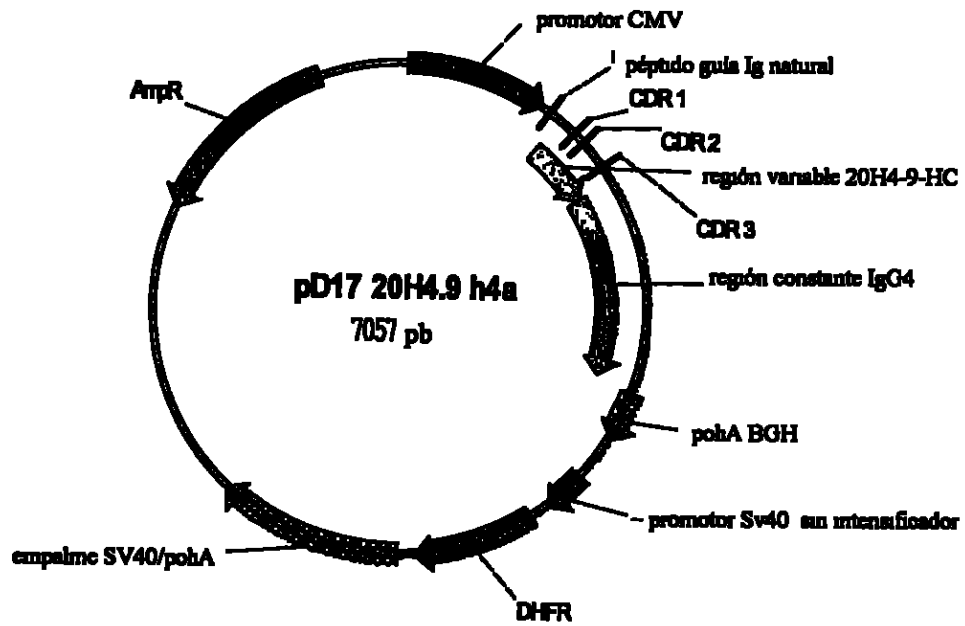


FIG 1

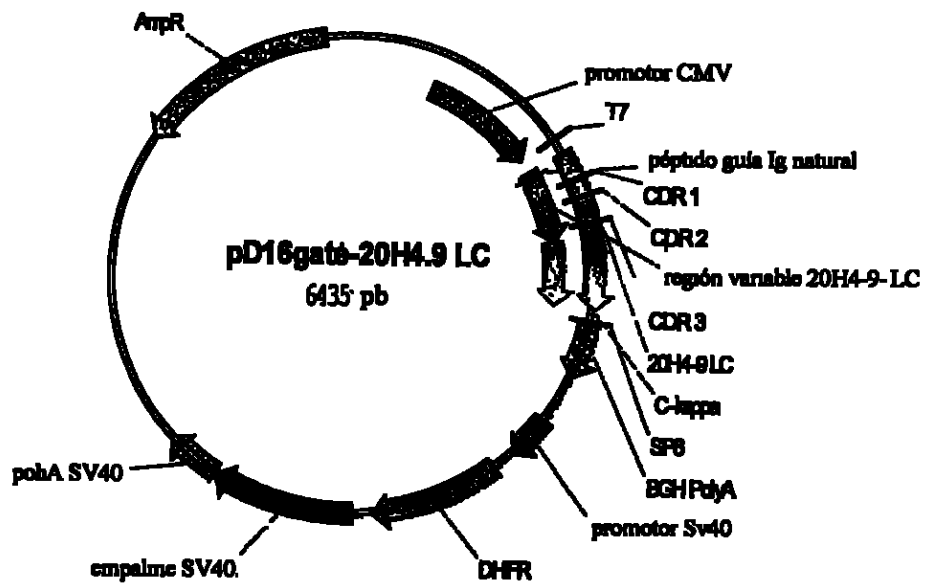


FIG 2

1 CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTTGACA TTGATTATTG ACTAGTTATT
 GCTACATGCC CGGTCTATAT GCGCAACTGT AACTAATAAC TGATCAATAA
 51 AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATATA TATGGAGTTC
 TTATCATTAG TTAATGCCCC AGTAATCAAG TATCGGGTAT ATACCTCAAG
 101 CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA
 GCGCAATGTA TTGAATGCCA TTTACCGGGC GGACCGACTG GCGGGTTGCT
 151 CCCCCGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATATA GTAACGCCAA
 GGGGGCGGGT AACTGCAGTT ATTACTGCAT ACAAGGGTAT CATTGCGGTT
 201 TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG GTAAACTGCC
 ATCCCTGAAA GGTAAGTCCA GTTACCCACC TGATAAATGC CATTTGACGG
 251 CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA
 GTGAACCGTC ATGTAGTTCA CATAGTATAC GGTTTCATGCG GGGGATAACT
 301 CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCCAG TACATGACCT
 GCAGTTACTG CCATTTACCG GCGGACCGT AATACGGGTC ATGTACTGGA
 351 TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT
 ATACCTGAA AGGATGAACC GTCATGTAGA TGCATAATCA GTAGCGATAA
 401 ACCATGGTGA TCGGTTTGTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT
 TGGTACCACT ACGCCAAAAC CGTCATGTAG TTACCCGCAC CTATCGCCAA
 451 TGAFTCACGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT
 ACTGAGTGCC CCTAAAGGTT CAGAGGTGGG GTAAGTGCAG TTACCCTCAA
 501 TGTTTTGGCA CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG TAACAACCTCC
 ACAAACCGT GGTTTTAGTT GGCCTGAAAG GTTTTACAGC ATTGTTGAGG
 551 GCCCCATTGA CGCAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT
 CGGGGTAACG GCGTTTACCC GCCATCCGCA CATGCCACCC TCCAGATATA
 601 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG
 TTCGTCTCGA GAGACCGATT GATCTCTTGG GTGACGAATG ACCGAATAGC
 ~~~~~  
 M K  
 651 AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTTGGTA CCGCCATGAA  
 TTTAATTATG CTGAGTGATA TCCCTCTGGG TTCGAACCAT GCGGGTACTT  
 péptido guía Ig natural  
 ~~~~~  
 H L W F F L L L V A A P R W V L S
 701 ACACCTGTGG TTCTTCCTCC TCCTGGTGGC AGCTCCCAGA TGGGTCTGT
 TGTGGACACC AAGAAGGAGG AGGACCACCG TCGAGGGTCT ACCCAGGACA
 natural Ig leader sequence
 ~~~~~  
 región va iable 20H4-9 HC  
 ~~~~~  
 Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E
 751 CCCAGGTGCA ACTACAGCAG TGGGGCGCAG GACTGTTGAA GCCTTCGGAG
 GGGTCCACGT TGATGTCGTC ACCCCGCGTC CTGACAACTT CGGAAGCCTC
 CDR 1
 ~~~~~  
 región variable 20H4-9 HC  
 ~~~~~  
 T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y
 801 ACCCTGTCCC TCACCTGCGC TGTCTATGGT GGGTCCTTCA GTGGTTACTA
 TGGGACAGGG AGTGGACGCG ACAGATACCA CCCAGGAAGT CACCAATGAT
 CDR 1 CDR 2
 ~~~~~  
 región variable 20H4-9 HC  
 ~~~~~  
 W S W I R Q S P E K G L E W I G E
 851 CTGGAGCTGG ATACGCCAGT CCCCAGAGAA GGGGCTGGAG TGGATTGGGG
 GACCTCGACC TATGCGGTCA GGGGTCTCTT CCCCAGCCTC ACCTAACCCC

FIG 3A

CDR 2

región variable 20H4-9 HC

I N H G G Y V T Y N P S L E S R
901 AAATCAATCA TGGTGGATAC GTCACCTACA ATCCGTCCCT CGAGAGTCGA
TTTAGTTAGT ACCACCTATG CAGTGGATGT TAGGCAGGGA GCTCTCAGCT
región variable 20H4-9 HC

V T I S V D T S K N Q F S L K L S
951 GTCACCATAT CAGTAGACAC GTCCAAGAAC CAGTTCTCCC TGAAGCTGAG
CAGTGGTATA GTCATCTGTG CAGGTTCTTG GTCAAGAGGG ACTTCGACTC
CDR 3

región variable 20H4-9 HC

S V T A A D T A V Y Y C A R D Y G
1001 CTCTGTGACC GCCGCGGACA CGGCTGTATA TTAGTGTCG AGGGACTATG
GAGACACTGG CGGCGCCTGT GCCGACATAT AATGACACGC TCCCTGATAC
CDR 3

región variable 20H4-9 HC

P G N Y D W Y F D L W G R G T L
1051 GTCCGGGGAA TTATGACTGG TACTTCGATC TCTGGGGCCG TGGCACCCCTG
CAGGCCCCCTT AATACTGACC ATGAAGCTAG AGACCCCGGC ACCGTGGGAC
dominio CH1 IgG4

región variable 20H4-9 HC

V T V S S A S T K G P S V F P L A
1101 GTCAGTGTCT CCTCAGCTAG CACCAAGGGC CCATCCGTCT TCCCCCTGGC
CAGTGACAGA GGAGTCGATC GTGGTTCCCG GGTAGGCAGA AGGGGGACCG
dominio CH1 IgG4

P C S R S T S E S T A A L G C L V
1151 GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG
CGGGACGAGG TCCTCGTGGA GGCTCTCGTG TCGGCGGGAC CCGACGGACC
dominio CH1 IgG4

K D Y F P E P V T V S W N S G A
1201 TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC
AGTTCTTGAT GAAGGGGCTT GGCCACTGCC ACAGCACCTT GAGTCCGCGG
dominio CH1 IgG4

L T S G V H T F P A V L Q S S G L
1251 CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT
GACTGGTGGC CGCACGTGTG GAAGGGCCGA CAGGATGTCA GGAGTCCTGA
dominio CH1 IgG4

Y S L S S V V T V P S S S L G T K
1301 CTACTCCCTC AGCAGCCTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACGA
GATGAGGGAG TCGTCGCACC ACTGGCACGG GAGGTGCTCG AACCCGTGCT

FIG 3B

```

                                dominio CH1 IgG4
                                ~~~~~
1351  T Y T C N V D H K P S N T K V D
      AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC
      TCTGGATGTG GACGTTGCAT CTAGTGTTTCG GGTCGTTGTG GTTCCACCTG
                                región constante IgG4
                                ~~~~~
      IgG4 CH1 domain
      ~~~~~
1401  K R V E S K Y G P P C P P C P A P
      AAGAGAGTTG AGTCCAAATA TGGTCCACCT TGCCCACCTT GCCCAGCACC
      TTCTCTCAAC TCAGGTTTAT ACCAGGTGGA ACGGGTGGAA CGGGTCGTGG
                                dominio CH2 IgG4
                                ~~~~~
1451  E F L G G P S V F L F P P K P K D
      TGAGTTCCTG GGGGGACCAT CAGTCTTCCT GTTCCCCCCA AAACCCAAGG
      ACTCAAGGAC CCCCCTGGTA GTCAGAAGGA CAAGGGGGGT TTTGGGTTCC
                                dominio CH2 IgG4
                                ~~~~~
1501  T L M I S R T P E V T C V V V D
      AACTCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC
      TGTGAGAGTA CTAGAGGGCC TGGGGACTCC AGTGACGCA CCACCACCTG
                                dominio CH2 IgG4
                                ~~~~~
1551  V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V
      GTGAGCCAGG AAGACCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGATGGCGT
      CACTCGGTCC TTCTGGGGCT CCAGGTCAAG TTGACCATGC ACCTACCGCA
                                dominio CH2 IgG4
                                ~~~~~
1601  E V H N A K T K P R E E Q F N S T
      GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA
      CCTCCACGTA TTACGGTTCT GTTTCGGCGC CCTCCTCGTC AAGTTGTCGT
                                dominio CH2 IgG4
                                ~~~~~
1651  Y R V V S V L T V L H Q D W L N
      CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAC
      GCATGGCACA CCAGTCGCAG GAGTGGCAGG ACGTGGTCCT GACCGACTTG
                                dominio CH2 IgG4
                                ~~~~~
1701  G K E Y K C K V S N K G L P S S I
      GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCCTCC CGTCTCCAT
      CCGTTCTCTCA TGTTCAAGTT CCAGAGGTTG TTTCCGGAGG GCAGGAGGTA
                                dominio CH3 IgG4
                                ~~~~~
                                dominio CH2 IgG4
                                ~~~~~
1751  E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
      CGAGAAACC ATCTCCAAG CCAAGGGGCA GCCCGAGAG CCACAGGTGT
      GCTCTTTTGG TAGAGGTTTC GGTTCCTCGT CGGGGCTCTC GGTGTCCACA
                                dominio CH3 IgG4
                                ~~~~~
1801  T L P P S Q E E M T K N Q V S L
      ACACCCTGCC CCCATCCCAG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG
      TGTGGGACGG GGGTAGGGTC CTCTCTACT GGTCTTGGT CCAGTCGGAC

```

FIG 3C

```

                                dominio CH3 IgG4
-----
1851  T C L V K G F Y P S D I A V E W E
      ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTACCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA
      TGGACGGACC AGTTTCCGAA GATGGGGTCG CTGTAGCGGC ACCTCACCCCT
                                dominio CH3 IgG4
-----
1901  S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
      GAGCAATGGG CAGCOGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG
      CTCGTTACCC GTCGGCCTCT TGTGTATGTT CTGGTGC GGA GGGCACGACC
                                dominio CH3 IgG4
-----
1951  S D G S F F L Y S R L T V D K S
      ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA GGCTAACCGT GGACAAGAGC
      TGAGGCTGCC GAGGAAGAAG GAGATGTCGT CCGATTGGCA CCTGTTCTCG
                                dominio CH3 IgG4
-----
2001  R W Q E G N V F S C S V M H E A L
      AGGTGGCAGG AGGGGAATGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
      TCCACCGTCC TCCCCTTACA GAAGAGTACG AGGCACTACG TACTCCGAGA
                                dominio CH3 IgG4
-----
2051  H N H Y T Q K S L S L S L G K
      GCACAACCAC TACACACAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCTG GGTAAATGAT
2101  CGTGTGGTG ATGTGTGTCT TCTCGGAGAG GGACAGAGAC CCATTTTACTA
      CTAGAGGGCC CTATTCTATA GTGTACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC
2151  GATCTCCCGG GATAAGATAT CACAGTGGAT TTACGATCTC GAGCGACTAG
      AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TCCCCCTCCC
      TCGGAGCTGA CACGGAAGAT CAACGGTCGG TAGACAACAA ACCGGGAGGG
2201  CCGTGCCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCACTGT CCTTTCCTAA
      GGCACGGAAG GAATGGGAC CTTCCACGGT GAGGGTGACA GGAAAGGATT
2251  TAAAATGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT
      ATTTTACTCC TTAAACGTAG CGTAACAGAC TCATCCACAG TAAGATAAGA
2301  GGGGGGTGGG GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA
      CCCCCACCC CACCCCGTCC GTGCGTTCCC CCTCCTAAAC CTTCTGTTAT
2351  GCAGGCATGC TGGGGATGCG GTGGGCTCTA TGGCTTCTGA GGCAGAAAGA
      CGTCCGTACG ACCCCTACGC CACCCGAGAT ACCGAAGACT CCGCCTTTCT
2401  ACCAGCTGGG GCTCTAGGGG GTATCCCCAC GCGCCCTGTA GCGGCGCATT
      TGGTCGACCC CGAGATCCCC CATAGGGGTG CCGGGGACAT CGCCGCGTAA
2451  AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG CGTGACCGCT ACACTTGCCA
      TTCGCGCCGC CCACACCACC AATGCGCGTC GCACTGGCGA TGTGAACGGT
2501  GCGCCCTAGC GCGCGCTCCT TTCGCTTCT TCCCTTCCTT TCTCGCCACG
      CGCGGGATCG CGGGCGAGGA AAGCGAAAGA AGGGAAGGAA AGAGCGGTGC
2551  TTCGCCGGGC CTCTCAAAA AGGGAAAAAA AGCATGCATC TCAATTAGTC
      AAGCGGCCCG GAGAGTTTTT TCCCTTTTTT TCGTACGTAG AGTTAATCAG
2601  AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC CTAACTCCGC
      TCGTTGGTAT CAGGGCGGGG ATGAGGCGG GTAGGGCGGG GATTGAGGCG
2651  CCAATTCCGC CCAATTCTCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTTAT
      GGTCAAGGCG GGTAAGAGGC GGGGTACCGA CTGATTAAAA AAAATAAATA
2701  GCAGAGGCCG AGGCCGCCCT GGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG
      CGTCTCCGGC TCCGGCGGAG CCGGAGACTC GATAAGGTCT TCATCACTCC
2751  AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AAAGCTTGA CAGCTCAGGG
      TCCGAAAAAA CCTCCGGATC CGAAAACGTT TTTCGAACCT GTCGAGTCCC
2801  CTGCGATTTC GCGCCAACT TGACGGCAAT CCTAGCGTGA AGGCTGGTAG
      GACGCTAAAG CGCGGTTTGA ACTGCCGTTA GGATCGCACT TCCGACCATC

```

FIG 3D

2851 GATTTTATCC CCGCTGCCAT CATGGTTCGA CCATTGAACT GCATCGTCGC
 CTAAATAGG GCGACGGTA GTACCAAGCT GGTAACCTGA CGTAGCAGCG
 2901 CGTGTCCTAA AATATGGGGA TTGGCAAGAA CGGAGACCTA CCCTGGCCTC
 GCACAGGGTT TTATACCCCT AACCGTTCTT GCCTCTGGAT GGGACCGGAG
 2951 CGCTCAGGAA CGAGTTCAAG TACTTCCAAA GAATGACCAC AACCTCTTCA
 GCGAGTCCTT GCTCAAGTTC ATGAAGGTTT CTTACTGGTG TTGGAGAAGT
 3001 GTGGAGGTA AACAGAATCT GGTGATTATG GGTAGGAAA CCTGGTTCTC
 CACCTTCCAT TTGTCTTAGA CCACTAATAC CCATCCTTTT GGACCAAGAG
 3051 CATTCCTGAG AAGAATCGAC CTTTAAAGGA CAGAATTAAT ATAGTTCTCA
 GTAAGGACTC TTCTTAGCTG GAAATTTCTT GTCTTAATTA TATCAAGAGT
 3101 GTAGAGAACT CAAAGAACCA CCACGAGGAG CTCATTTTCT TGCCAAAAGT
 CATCTCTTGA GTTTCTTGGT GGTGCTCTCT GAGTAAAAGA ACGGTTTTC
 3151 TTGGATGATG CCTTAAGACT TATTGACAA CCGGAATTGG CAAGTAAAGT
 AACCTACTAC GGAATTCTGA ATAACCTGTT GGCTTAACC GTTCATTTC
 3201 AGACATGGTT TGGATAGTCG GAGGCAGTTC TGTTTACCAG GAAGCCATGA
 TCTGTACCAA ACCTATCAGC CTCCTGCAAG ACAAATGGTC CTTCCGTACT
 3251 ATCAACCAGG CCACCTTAGA CTCTTTGTGA CAAGGATCAT GCAGGAATTT
 TAGTTGGTCC GGTGGAATCT GAGAAACACT GTTCCTAGTA CGTCCTTAAA
 3301 GAAAGTGACA CGTTTTTCCC AGAAATTGAT TTGGGGAAAT ATAACTTCT
 CTTTCACTGT GCAAAAAGGG TCTTTAACTA AACCCCTTTA TATTTGAAGA
 3351 CCCAGAATAC CCAGGCGTCC TCTCTGAGGT CCAGGAGGAA AAAGGCATCA
 GGGTCTTATG GGTCCGCAGG AGAGACTCCA GGTCTCTCTT TTTCCGTAGT
 3401 AGTATAAGTT TGAAGTCTAC GAGAAGAAAG ACTAACAGGA AGATGCTTTC
 TCAATATCAA ACTTCAGATG CTCTTCTTTC TGATTGTCCT TCTACGAAAG
 3451 AAGTTCTCTG CTCCCCTCCT AAAGCTATGC ATTTTATATA GACCATGGGA
 TTCAAGAGAC GAGGGGAGGA TTTCGATACG TAAAAATATT CTGGTACCCT
 3501 CTTTTGCTGG CTTTAGATCT CTTTGTGAAG GAACCTTACT TCTGTGGTGT
 GAAAACGACC GAAATCTAGA GAAACACTTC CTTGGAATGA AGACACCACA
 3551 GACATAATTG GACAAACTAC CTACAGAGAT TTAAAGCTCT AAGGTAAATA
 CTGTATTAACT CTGTTTGATG GATGTCTCTA AATTTCGAGA TTCCATTTAT
 3601 TAAAATTTTT AAGTGTATAA TGTGTTAAAC TACTGATTCT AATTGTTTGT
 ATTTTAAAAA TTCACATATT ACACAATTTG ATGACTAAGA TTAACAAACA
 3651 GTATTTTAGA TTCCAACCTA TGGAACTGAT GAATGGGAGC AGTGGTGGA
 CATAAAATCT AAGGTTGGAT ACCTTGACTA CTTACCCCTG TCACCACCTT
 3701 TCCCTTTAAT GAGGAAAACC TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG
 ACGGAAATTA CTCCTTTTGG ACMAAACGAG TCTTCTTTAC GGTAGATCAC
 3751 ATGATGAGGC TACTGCTGAC TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAG
 TACTACTCCG ATGACGACTG AGAGTTGTAA GATGAGGAGG TTTTTCTTC
 3801 AGAAAGGTAG AAGACCCCAA GGACTTTCCT TCAGAATTGC TAAGTTTTTT
 TCTTTCCATC TTCTGGGGTT CCTGAAAGGA AGTCTTAACG ATTCAAAAAA
 3851 GAGTCATGCT GTGTTTAGTA ATAGAACTCT TGCTTGCTTT GCTATTTACA
 CTCAGTACGA CACAAATCAT TATCTTGAGA ACGAACGAAA CGATAAATGT
 3901 CCACAAAGGA AAAAGCTGCA CTGCTATACA AGAAAATTAT GGAAAAATAT
 GGTGTTTCCT TTTTCGACGT GACGATATGT TCTTTTAATA CCTTTTTATA
 3951 TCTGTAACCT TTATAAGTAG GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT
 AGACATTGGA AATATTATC CGTATTGTCA ATATTAGTAT TGTATGACAA
 4001 TTTTCTTACT CCACACAGGC ATAGAGTGTC TGCTATTAAT AACTATGCTC
 AAAAGAATGA GGTGTGTCCG TATCTCACAG ACGATAATTA TTGATACGAG
 4051 AAAAATTGTG TACCTTTAGC TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA
 TTTTAAACAC ATGGAAATCG AAAAATTAAA CATTTCCCA ATTATTCCTT
 4101 TATTTGATGT ATAGTGCCTT GACTAGAGAT CATAATCAGC CATACCACAT
 ATAACTACA TATCACGGAA CTGATCTCTA GTATTAGTCG GTATGGTGTA
 4151 TTGTAGAGGT TTTACTTGCT TTAATAAAC TCCCACACCT CCCCCTGAAC
 AACATCTCCA AAATGAACGA AATTTTTTGG AGGGTGTGGA GGGGACTTG
 4201 CTGAAACATA AAATGAATGC AATTGTTGTT GTTAACTTGT TTATTGCAGC

FIG 3E

4251 GACTTTGTAT TTTACTTACG TTAACAACAA CAATTGAACA AATAACGTCG
 TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT ACAAATAAAG
 AATATTACCA ATGTTTATTT CGTTATCGTA GTGTTTAAAG TGTTTATTTT
 4301 CATTTTTTTC ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAAACT CATCAATGTA
 GTAAAAAAG TGACGTAAGA TCAACACCAA ACAGGTTTGA GTAGTTACAT
 4351 TCTTATCATG TCTGGATCGG CTGGATGATC CTCCAGCGCG GGGATCTCAT
 AGAATAGTAC AGACCTAGCC GACCTACTAG GAGGTCGCGC CCCTAGAGTA
 4401 GCTGGAGTTC TTCGCCCACC CCAACTTGTT TATTGCAGCT TATAATGGTT
 CGACCTCAAG AAGCGGGTGG GGTTGAACAA ATAACGTCGA ATATTACCAA
 4451 ACAAATAAAG CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA
 TGTTTATTTT GTTATCGTAG TGTTTAAAGT GTTTATTTTCG TAAAAAAGT
 4501 CTGCATTCTA GTTGTGGTTT GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT
 GACGTAAGAT CAACACCAA CAGGTTTGAG TAGTTACATA GAATAGTACA
 4551 CTGTATACCG TCGACCTCTA GCTAGAGCTT GCGGTAATCA TGGTCATAGC
 GACATATGGC AGCTGGAGAT CGATCTCGAA CCGCATTAGT ACCAGTATCG
 4601 TGTTTCCTGT GTGAAATTGT TATCCGCTCA CAATTCACCA CAACATACGA
 ACAAAGGACA CACTTTAACA ATAGGCGAGT GTTAAGGTGT GTTGTATGCT
 4651 GCCGGAAGCA TAAAGTGTA AGCCTGGGGT GCCTAATGAG TGAGCTAACT
 CGGCCTTCGT ATTTACATT TCGGACCCCA CGGATTACTC ACTCGATTGA
 4701 CACATTAATT GCGTTGCGCT CACTGCCCGC TTTCCAGTCG GGAAACCTGT
 GTGTAATTAA CGCAACGCGA GTGACGGGCG AAAGGTCAGC CCTTTGGACA
 4751 CGTGCCAGCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG
 GCACGGTCGA CGTAATTACT TAGCCGGTTG CCGCGCCCTC TCCGCCNAAC
 4801 CGTATTGGGC GCTCTTCCGC TTOCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
 GCATAACCCG CGAGAAGGCG AAGGAGCGAG TGACTGAGCG ACGCGAGCCA
 4851 CGTTCGGCTG CCGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
 GCAAGCCGAC GCCGCTCGCC ATAGTCGAGT GAGTTTCCGC CATTATGCCA
 4901 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
 ATAGGTGTCT TAGTCCCCTA TTGCGTCCCT TCTTGACAC TCGTTTTCCG
 4951 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
 GTCGTTTTCC GGTCTTGCG ATTTTCCCG CGCAACGACC GCAAAAGGT
 5001 TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
 ATCCGAGCGG GGGGACTGC TCGTAGTGT TTTAGCTGCG AGTTTCACTT
 5051 GGTGGCGAAA CCCGAAGGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCTGGA
 CCACCGCTTT GGGCTGTCTT GATATTTCTA TGGTCCGCAA AGGGGGACCT
 5101 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC GTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
 TCGAGGGAGC ACGCGAGAGG ACAAGGCTGG GACGGCGAAT GGCCTATGGA
 5151 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCAGCT
 CAGGCGGAAA GAGGGAAGCC CTTCCGACCG CGAAAGAGTT ACGAGTCCGA
 5201 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
 CATCCATAGA GTCAAGCCAC ATCCAGCAAG CGAGGTTTCA CCCGACACAC
 5251 CAGGAACCCC CGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATCG
 GTGCTTGGGG GGCAAGTCGG GCTGGCGACG CGGAATAGGC CATTGATAGC
 5301 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
 AGAACTCAGG TTGGGCCATT CTGTGCTGAA TAGCGGTGAC CGTCGTGGGT
 5351 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 GACCATTGTC CTAATCGTCT CGCTCCATAC ATCGCCACG ATGTCTCAAG
 5401 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
 AACTTCACCA CCGGATTGAT GCCGATGTGA TCTTCTGTC ATAAACCAT
 5451 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
 GACGCGAGAC GACTTCGGTC AATGGAAGCC TTTTCTCAA CCATCGAGAA
 5501 GATCCGGCAA ACAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG
 CTAGGCCGTT TGTTGGTGG CGACCATCGC CACCAAAAAA ACAACGTTT
 5551 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
 GTCGTCTAAT GCGCGTCTTT TTTTCTAGA GTTCTTCTAG GAACTAGAA

FIG 3F

5601 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AACTCACGT TAAGGGATTT
AAGATGCCCC AGACTGCGAG TCACCTTGCT TTTGAGTGCA ATTCCCTAAA
5651 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
ACCAGTACTC TAATAGTTTT TCCTAGAAGT GGATCTAGGA AAATTTAATT
5701 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTGGGTCTGA
TTTACTTCAA AATTTAGTTA GATTTCTAT ATACTCATTT GAACCAAGCT
5751 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
GTCAATGGTT ACGAATTAGT CACTCCGTGG ATAGAGTCGC TAGACAGATA
5801 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
AAGCAAGTAG GTATCAACGG ACTGAGGGGC AGCACATCTA TTGATGCTAT
5851 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
GCCCTCCCGA ATGGTAGACC GGGGTCACGA CGTTACTATG GCGCTCTGGG
5901 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
TGCGAGTGGC CGAGGTCTAA ATAGTCGTTA TTTGGTCGGT CGGCCTTCCC
5951 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
GGCTCGCGTC TTCACCAGGA CGTTGAAATA GGCGGAGGTA GGTGAGATAA
6001 AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
TTAACAACGG CCCTTCGATC TCATTCATCA AGCGGTCAAT TATCAAACGC
6051 CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
GTTGCAACAA CCGTAACGAT GTCCGTAGCA CCACAGTCGC AGCAGCAAAC
6101 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCTAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
CATACCGAAG TAAGTCGAGG CCAAGGGTTG CTAGTTCCGC TCAATGTACT
6151 TCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
AGGGGGTACA ACACGTTTTT TCGCCAATCG AGGAAGCCAG GAGGCTAGCA
6201 TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
ACAGTCTTCA TTCAACCGGC GTCACAATAG TGAGTACCAA TACCGTCGTG
6251 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
ACGTATTAAG AGAATGACAG TACGGTAGGC ATTCTACGAA AAGACACTGA
6301 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGACCGAG
CCACTCTGA GTTGGTTCAG TAAGACTCTT ATCACAACG CCGCTGGCTC
6351 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
AACGAGAACG GGCCGCGAGT ATGCCCTATT ATGGCGCGGT GTATCGTCTT
6401 CTTTAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGCGGGCG AAAACTCTCA
GAAATTTTCA CGAGTAGTAA CCTTTTGCAA GAAGCCCCGC TTTTGAGAGT
6451 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
TCCTAGAATG GCGACAACCT TAGGTCAAGC TACATTGGGT GAGCACGTGG
6501 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
GTTGACTAGA AGTCGTAGAA AATGAAAGTG GTCGCAAAGA CCCACTCGTT
6551 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
TTTGTCTTTC CGTTTTACGG CGTTTTTTCC CTTATTCCCG CTGTGCCTTT
6601 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
ACAACTTATG AGTATGAGAA GGAAAAAGTT ATAATAACTT CGTAAATAGT
6651 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
CCCAATAACA GAGTACTCGC CTATGTATAA ACTTACATAA ATCTTTTTAT
6701 AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCQC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
TTGTTTATCC CCAAGGCGCG TGTAAAGGGG CTTTTACGG TGGACTGCAG
6751 GACGGATCGG GAGATCTGCT AGGTGACCTG AGGCGCGCCG GCTTCGAATA
CTGCCTAGCC CTCCTAGACGA TCCACTGGAC TCCGCGCGGC CGAAGCTTAT
6801 GCCAGAGTAA CCTTTTTTTT TAATTTTATT TTATTTTATT TTTGAGATGG
CGGTCTCATT GGAAAAAAA ATTAAATAA AATAAAATAA AACTCTACC
6851 AGTTTGGCGC CGATCTCCCG ATCCCTATG GTCGACTCTC AGTACAATCT
TCAAACCGCG GCTAGAGGGC TAGGGGATAC CAGCTGAGAG TCATGTTAGA
6901 GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATC TGCTCCCTGC TTGTGTGTTG
CGAGACTACG GCGTATCAAT TCGGTCATAG ACGAGGGACG AACACACAAC
6951 GAGGTCGCTG AGTAGTGCGC GAGCAAAATT TAAGCTACAA CAAGGCAAGG

FIG 3G

CTCCAGCGAC TCATCAGCG CTCGTTTTAA ATTCGATGTT GTTCCGTTCC
7001 CTTGACCGAC AATTGCATGA AGAATCTGCT TAGGGTTAGG CGTTTTCGCG
GAACTGGCTG TTAACGTACT TCTTAGACGA ATCCCAATCC GCAAAACGCG
7051 TGCTTCG
ACGAAGC

FIG 3H

```

1   GACGGATCGG GAGATCTGCT AGCCCGGGTG ACCTGAGGCG CGCCGGGCTTC
   CTGCCTAGCC CTCTAGACGA TCGGGCCAC TGGACTCCGC GCGGCCGAAG
51  GAATAGCCAG AGTAACCTTT TTTTAAATT TTATTTTATT TTATTTTGA
   CTTATCGGTC TCATTGGAAA AAAAAATTAA AATAAAATAA AATAAAACT
101 GATGGAGTTT GCGCCGATC TCCCGATCCC CTATGGTCGA CTCTCAGTAC
   CTACCTCAAA CCGCGGCTAG AGGGCTAGGG GATACCAGCT GAGAGTCATG
151 AATCTGCTCT GATGCCGCAT AGTTAAGCCA GTATCTGCTC CCTGCTTGTC
   TTAGACGAGA CTACGGCGTA TCAATTCGGT CATAGACGAG GGACGAACAC
201 TGTGGAGGT CGCTGAGTAG TCGCGAGCA AAATTTAAGC TACAACAAGG
   ACAACCTCCA GCGACTCATC ACGCGCTCGT TTTAAATTCG ATGTTGTTCC
251 CAAGGCTTGA CCGACRATTG CATGAAGAAT CTGCTTAGGG TTAGGCGTTT
   GTTCCGAACT GGCTGTAAAC GTACTTCTTA GACGAATCCC AATCCGCAAA
301 TCGCTGCTT CCGCATGTAC GGGCCAGATA TACGCGTTGA CATTGATTAT
   ACGCGACGAA GCGCTACATG CCCGGTCTAT ATGCGCAACT GTAACATAA
351 TGACTAGTTA TTAATAGTAA TCAATTACGG GGTCATTAGT TCATAGCCCA
   ACTGATCAAT AATTATCATT AGTTAATGCC CCAGTAATCA AGTATCGGGT
401 TATATGGAGT TCCGCGTTAC ATAACCTTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG
   ATATACCTCA AGGCGCAATG TATTGAATGC CATTACCGG GCGGACCGAC
451 ACCGCCAAC GACCCCGCC CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA
   TGGCGGGTTG CTGGGGGCGG GTAACTGCAG TTATTACTGC ATACAAGGGT
501 TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA
   ATCATGCGG TTATCCCTGA AAGGTAAGT CAGTTACCA CCTCATAAAT
551 CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC
   GCCATTTGAC GGGTGAACCG TCATGTAGTT CACATAGTAT ACGGTTCATG
601 GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAAATG GCGCGCCTGG CATTATGCCC
   CGGGGGATAA CTGCAGTTAC TGCCATTTAC CGGGCGGACC GTAATACGGG
651 AGTACATGAC CTTATGGGAC TTTCCTACTT GGCACTACAT CTACGTATTA
   TCATGTACTG GAATACCCTG AAAGGATGAA CCGTCATGTA GATGCATAAT
701 GTCATCGCTA TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG
   CAGTAGCGAT AATGGTACCA CTACGCCAAA ACCGTCAATG AGTTACCCGC
751 TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC CCCATTGACG
   ACCTATCGOC AAATGAGTG CCCCTAAAGG TTCAGAGGTG GGGTAACTGC
801 TCAATGGGAG TTTGTTTTGG CACCAAATC AACGGGACTT TCCAAAATGT
   AGTTACCGC AAACAAAACC GTGGTTTTAG TTGCCCTGAA AGGTTTTACA
851 CGTAACAACCT CCGCCCCATT GACGCAATG GCGGTAGGC GTGTACGGTG
   GCATTGTTGA GCGGGGTAA CTGCGTTTAC CCGCCATCCG CACATGCCAC
901 GGAGGTCTAT ATAAGCAGAG CTCTCTGGCT AACTAGAGAA CCCACTGCTT
   CCTCCAGATA TATTCGTCTC GAGAGACCGA TTGATCTCTT GGGTGACGAA
951 ACTGGCTTAT CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGAGAC CCAAGCTTAT
   TGACCGAATA GCTTTAATTA TGCTGAGTGA TATCCCTCTG GGTTCGAATA

                               guia Ig natural
                               ~~~~~~
                               M E A P A Q
1001 CAACAAGTTT GTACAAAAA GCAGGCTGGT ACCATGGAAG CCCCAGCTCA
   GTTGTTCAAA CATGTTTTT CGTCCGACCA TGGTACCTTC GGGGTCGAGT
                               ~~~~~~

                               péptido guía Ig natural
                               ~~~~~~
                               L L F L L L L W L P D T T G E I V
1051 GCTTCTCTTC CTCCTGCTAC TCTGGCTCCC AGATACCACC GGAGAAATTG
   CGAAGAGAAG GAGGACGATG AGACCGAGGG TCTATGGTGG CCTCTTTAAC
```

FIG 4A

```

región variable 20H4-9 LC
-----
  L T Q S P A T L S L S P G E R A
1101  TGTTCACACA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTT TGTCTCCAGG GGAAAGAGCC
      ACAACTGTGT CAGAGGTCGG TGGGACAGAA ACAGAGGTCC CCTTTCTCGG
región variable 20H4-9 LC
-----
                                CDR 1
                                -----
      T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
1151  ACCCTCTCCT GCAGGGCCAG TCAGAGTGTT AGCAGCTACT TAGCCTGGTA
      TGGGAGAGGA CGTCCCGGTC AGTCTCACAA TCGTCGATGA ATCGGACCAT
región variable 20H4-9 LC
-----
                                CDR 2
                                -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N
1201  CCAACAGAAA CCTGGCCAGG CTCCAGGCT CCTCATCTAT GATGCATCCA
      GGTTCGTCTT GGACCGGTCC GAGGGTCOGA GGAGTAGATA CTACGTAGGT
región variable 20H4-9 LC
-----
                                CDR 2
                                -----
      R A T G I P A R F S G S G S G T
1251  ACAGGGCCAC TGGCATCCCA GCCAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA
      TGTCCCGGTG ACCGTAGGGT CGGTCCAAGT CACCGTCACC CAGACCCTGT
región variable 20H4-9 LC
-----
      D F T L T I S S L E P E D F A V Y
1301  GACTTCACTC TCACCATCAG CAGCCTAGAG CCTGAAGATT TTGCAGTTTA
      CTGAAGTGAG AGTGGTAGTC GTCGGATCTC GGACTTCTAA AACGTCAAAT
                                CDR 3
                                -----
región variable 20H4-9 LC
-----
      Y C Q Q R S N W P P A L T F G G C
1351  TTACTGTCAG CAGCGTAGCA ACTGGCCTCC GCGGCTCACT TTCGGCGGAG
      AATGACAGTC GTCGCATCGT TGACCGGAGG CCGCGAGTGA AMCCCGCCTC
                                C-kappa
                                -----
región variable 20H4-9 LC
-----
      T K V E I K R T V A A P S V F I
1401  GGACCAAGGT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC
      CCTGGTTCCA CCTCTAGTTT GCATGCCACC GACGTGGTAG ACAGAAGTAG
                                C-kappa
                                -----
      F P P S D E Q L K S G T A S V V C
1451  TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG
      AAGGGCGGTA GACTACTCGT CAACTTTAGA CCTTGACGGA GACAACACAC
                                C-kappa
                                -----
      L L N N F Y P R E A K V Q W K V D
1501  CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG
      GGACGACTTA TTGAAGATAG GSTCTCTCCG GTTTCATGTC ACCTTCACC
```

FIG 4B

```

                                C-kappa
-----
      N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
1551 ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC
      TATTGCGGGA GGTAGCCCA TTGAGGGTCC TCTCACAGTG TCTCGTCTTG
                                C-kappa
-----
      S K D S T Y S L S S T L T L S K A
1601 AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC
      TCGTTCCTGT CGTGGATGTC GGAGTCGTCTG TGGGACTGCG ACTCGTTTCG
                                C-kappa
-----
      D Y E K H K V Y A C E V T H Q G I
1651 AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC
      TCTGATGCTC TTTGTGTTTC AGATGCGGAC GCTTCAGTGG GTAGTCCCGG
                                C-kappa
-----
      S S P V T K S F N R G E C
1701 TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTAGACCCAG
      ACTCGAGCGG GCAGTGTTTC TCGAAGTTGT CCCCTCTCAC AATCTGGGTC
1751 CTTTCTTGTA CAAAGTGGTT GATCTAGAGG GCCCTATTCT ATAGTGTAC
      GAAAGAACAT GTTTCACCA CTAGATCTCC CGGGATAAGA TATCACAGTG
1801 CTAAATGCTA GAGCTCGCTG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA
      GATTACGAT CTCGAGCGAC TAGTCGGAGC TGACACGGAA GATCAACGGT
1851 GCCATCTGTT GTTTGCCCTT CCCCGTGCC TTCTTGACC CTGGAAGGTG
      CGGTAGACAA CAAACGGGGA GGGGGCACGG AAGGAAGTGG GACCTTCCAC
1901 CCACTCCCAC TGTCTTTTCC TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT
      GGTGAGGGTG ACAGGAAAGG ATTATTTTAC TCCTTTAACG TAGCGTAACA
1951 CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT GGGGTGGGGC AGGACAGCAA
      GACTCATCCA CAGTAAGATA AGACCCCCCA CCCCACCCCG TCCTGTCGTT
2001 GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT GCGGTGGGCT
      CCCCTCCTA ACCCTTCTGT TATCGTCCGT ACGACCCCTA CGCCACCCGA
2051 CTATGGCTTC TGAGCGGAA AGAACCAGCT GGGGCTCTAG GGGGTATCCC
      GATACCAAG ACTCCGCCTT TCTTGGTCTG CCCCAGATC CCCCATAGGG
2101 CACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
      GTGCGCGGGA CATCGCGCGG TAATTGCGCG CGCCGACACC ACCAATGCGC
2151 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT
      GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTGCGGGGA TCGCGGGCGA GGAAAGCGAA
2201 TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCGG GGCCTCTCAA AAAAGGGAAA
      AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGCAAGCGGC CCGGAGAGTT TTTTCCCTTT
2251 AAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC
      TTTTCGTACG TAGAGTTAAT CAGTCGTTGG TATCAGGGCG GGGATTGAGG
2301 GCCCATCCCG CCCCTAACTC CGCCAGTTC CGCCCATTC CTGCCCCATG
      CGGGTAGGGC GGGGATTGAG GCGGGTCAAG GCGGGTAAGA GGCGGGGTAC
2351 GCTGACTAAT TTTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT
      CGACTGATTA AAAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGGAGA
2401 GAGCTATTTC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG
      CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG ATCCGAAAAC
2451 CAAAAGCTT GGGGGGACAG CTCAGGGCTG CGATTTGCGC CCAAACCTGA
      GTTTTTCGAA CCCCCCTGTC GAGTCCCGAC GCTAAAGCGC GGTTTGAACT
2501 CGGCAATCCT AGCGTGAAGG CTGGTAGGAT TTTATCCCCG CTGCCATCAT
      GCCGTTAGGA TCGCACTTCC GACCATCCTA AAATAGGGGC GACGGTAGTA
2551 GGTTCGACCA TTGAACTGCA TCGTCGCGGT GTCCCAAAT ATGGGGATTG
      CCAAGCTGGT AACTTGACGT AGCAGCGGCA CAGGGTTTTA TACCCCTAAC

```

FIG 4C

2601 GCAAGAACGG AGACCTACCC TGGCCTCCGC TCAGGAACGA GTTCAAGTAC
CGTTCCTGGC TCTGGATGGG ACCGGAGGCG AGTCCTTGCT CAAGTTCATG
2651 TTCCAAAGAA TGACCACAAC CTCTTCAGTG GAAGGTAAAC AGAATCTGGT
AAGGTTTCTT ACTGGTGTG GAGAAGTCAC CTTCCATTTG TCTTAGACCA
2701 GATTATGSGT AGGAAAACCT GGTTCCTCAT TCCTGAGAAG AATCGACCTT
CTAATACCCA TCCTTTTGGG CCAAGAGGTA AGGACTCTTC TTAGCTGGAA
2751 TAAAGGACAG AATTAATATA GTTCTCAGTA GAGAACTCAA AGAACCACCA
ATTTCTGTG TTAATTATAT CAAGAGTCAT CTCTTGAGTT TCTTGGTGGT
2801 CGAGGAGCTC ATTTTCTTGC CAAAAGTTTG GATGATGCC TAAAGACTTAT
GCTCCTCGAG TAAAAGAACG GTTTTCAAAC CTACTACGGA ATTCTGAATA
2851 TGAACNACCG GAATTGGCAA GTAAAGTAGA CATGGTTTGG ATAGTCGGAG
ACTTGTGGC CTTAACCGTT CATTTTCATCT GTACCAAACC TATCAGCCTC
2901 GCAGTTCGT TTAACAGGAA GCCATGAATC AACCAGGCCA CCTCAGACTC
CGTCAAGACA AATGGTCCTT CGGTACTTAG TTGGTCCGGT GGAGTCTGAG
2951 TTTGTGACAA GGATCATGCA GGAATTTGAA AGTGACACGT TTTTCCCAGA
AAACACTGTT CCTAGTACGT CCTTAAACTT TCAGTGTGCA AAAAGGGTCT
3001 AATTGATTTG GGGAAATATA AACTTCTCCC AGAATACCCA GGCCTCCTCT
TTAACTAAAC CCCTTTATAT TTGAAGAGGG TCTTATGGGT CCGCAGGAGA
3051 CTGAGGTCCA GGAGGAAAAA GGCATCAAGT ATAAGTTTGA AGTCTACGAG
GACTCCAGGT CCTCCTTTTT CCGTAGTTCA TATTCAAAC TCAGATGCTC
3101 AAGAACAGGT AACAGGAAGA TGCTTTCAAG TTCTCTGCTC CCTCCTAAA
TTCTTTCTGA TTGTCCTTCT ACGAAAGTTC AAGAGACGAG GGGAGGATTT
3151 GCTATGCATT TTTATAAGAC CATGGGACTT TTGCTGGCTT TAGATCTGAT
CGATACGTAA AAATATTCTG GTACCTGAA AACGACCGAA ATCTAGACTA
3201 CTTTGTGAAG GAACCTTACT TCTGTGGTGT GACATAATTG GACAACTAC
GAAACACTTC CTTGGAATGA AGACACCACA CTGTATTAAC CTGTTTGATG
3251 CTACAGAGAT TTAAAGCTCT AAGGTAAATA TAAAATTTT AAGTGATAA
GATGTCTCTA AATTCGAGA TTCCATTTAT ATTTTAAAA TTCACATAT
3301 TGTGTTAAAC TACTGATTCT AATTGTTTGT GTATTTTAGA TTCCAACCTA
ACACAATTTG ATGACTAAGA TTAACAAACA CATAAAATCT AAGGTTGGAT
3351 TGGAACTGAT GAATGGGAGC AGTGGTGGAA TGCCTTTAAT GAGGAAAACC
ACCTTGACTA CTTACCCTCG TCACCACCTT ACGGAAATTA CTCTTTTGG
3401 TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG ATGATGAGGC TACTGCTGAC
ACAAAACGAG TCTTCTTTAC GGTAGATCAC TACTACTCCG ATGACGACTG
3451 TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAAG AGAAAGGTAG AAGACCCCAA
AGAGTTGTAA GATGAGGAGG TTTTTTCTT TCTTTCCATC TTCTGGGGTT
3501 GGACTTTCCT TCAGAATTGC TAAGTTTTTT GAGTCATGCT GTGTTTAGTA
CCTGAAAGGA AGTCTTAACG ATTCAAAAA CTCAGTACGA CACAAATCAT
3551 ATAGAACTCT TGCTTGCTTT GCTATTTACA CCACAAAGGA AAAAGCTGCA
TATCTTGAGA ACGAACGAAA CGATAAATGT GGTGTTTCCT TTTTCGACGT
3601 CTGCTATACA AGAAATTAT GGAATAATAT TCTGTAACCT TTATAAGTAG
GACGATATGT TCTTTTAATA CCTTTTATA AGACATTGGA AATATTCATC
3651 GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT TTTTCTTACT CCACACAGGC
CGTATTGTCA ATATTAGTAT TGTATGACAA AAAAGAATGA GGTGTGTCCG
3701 ATAGAGTGTC TGCTATTAA TACTATGCTC AAAAATTGTG TACCTTTAGC
TATCTCACAG ACGATAATTA TTGATACGAG TTTTAAACAC ATGGAAATCG
3751 TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA TATTTGATGT ATAGTGCCTT
AAAAATTAAA CATTTCCCA ATTATTCCTT ATAAACTACA TATCACGGAA
3801 GACTAGAGAT CGATCATAAT CAGCCATACC ACATTTGTAG AGGTTTTACT
CTGATCTCTA GCTAGTATTA GTCGGTATGG TGTAACATC TCCAAATGA
3851 TGCTTTAAAA AACCTCCAC ACCTCCCCCT GAACCTGAAA CATAAAATGA
ACGAAATTTT TTGGAGGGTG TGGAGGGGGA CTGGACTTT GTATTTTACT
3901 ATGCAATTGT TGTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA
TACGTTAACA ACAACAATTG AACAAATAAC GTCGAATATT ACCAATGTTT

FIG 4D

```

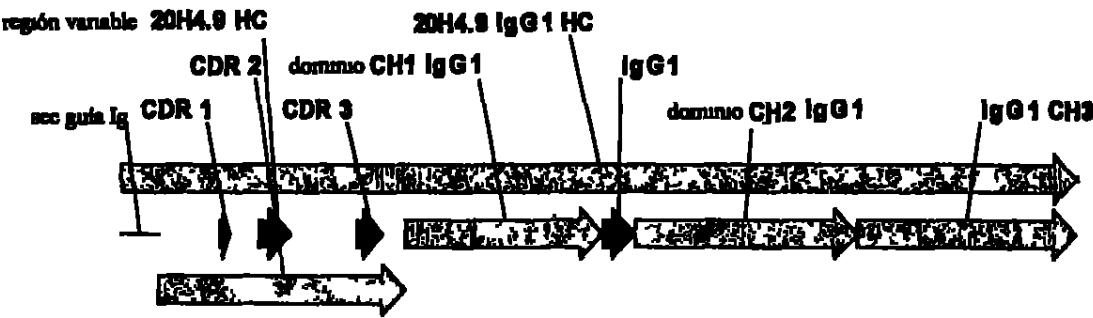
3951 TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCAGTGA
ATTTGTTAT CGTAGTGTTC AAAGTGTTC TTTGTAATA AAAGTGACGT
4001 TTCTAGTTGT GGTTCGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA
AAGATCAACA CCAACAGGT TTGAGTAGTT ACATAGAATA GTACAGACCT
4051 TCGGCTGGAT GATCCTCCAG CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC
AGCCGACCTA CTAGGAGGTC GCGCCCTAG AGTACGACCT CAAGAAGCGG
4101 CACCCCAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG
GTGGGGTTGA ACAAATAACG TCGAATAITA CCAATGTTTA TTTGTTATC
4151 CATCACAAAT TTACAAATA AAGCATTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG
GTAGTGTTTA AAGTGTTTAT TTCGTAAAAA AAGTGACGTA AGATCAACAC
4201 GTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGTAT ACCGTGACCT
CAACAGGTT TGAGTAGTTA CATAGAATAG TACAGACATA TGGCAGCTGG
4251 TCTAGCTAGA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA
AGATCGATCT CGAACCGCAT TAGTACCACT ATCGACAAAG GACACACTTT
4301 TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT
AACAATAGGC GAGTGTTAAG GTGTGTTGTA TGCTCGGCCT TCGTATTTCA
4351 GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG
CATTTCCGAC CCCACGGATT ACTCACTCGA TTGAGTGTA TTAACGCAAC
4401 CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAC CTGTCGTGCC AGCTGCATTA
GCGAGTGACG GCGGAAAGGT CAGCCCTTTG GACAGCACGG TCGACGTAAT
4451 ATGAATCGCG CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT
TACTTACCGG GTTGCCTGCT CCTCTCGCC AAACGCATAA CCCGCGAGAA
4501 CCGCTTCTCT GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CCGTCTGTTG GCTGCGGCGA
GGCGAAGGAG CGAGTGACTG AGCGACGCGA GCGAGCAAGC CGACGCGGCT
4551 GCGGTATCAG CTCACTCAA GCGGTAATA CCGTTATCCA CAGAATCAGG
CGCCATAGTC GAGTGAGTTT CCGCCATTAT GCCAATAGGT GTCTTAGTCC
4601 GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA
CCTATTGCGT CCTTTCTTGT AACTCGTTT TCCGGTCGTT TTCCGGTCCT
4651 ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCTT
TGGCATTTTT CCGGCGCAAC GACCGCAAAA AGGTATCCGA GCGGGGGGGA
4701 GACGAGCATC AAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC
CTGCTCGTAG TGTTTTTAGC TGCGAGTTCA GTCTCCACCG CTTTGGGCTG
4751 AGGAGTATA AGATACCAGG CGTTTCCCC TGGAGGCTCC CTCGTGCGCT
TCCTGATATT TCTATGGTCC GCAAAGGGGG ACCTTCGAGG GAGCAGCGCA
4801 CTCCTGTTCC GACCCGTGCG CTTACCGGAT AGCTGTCCGC CTTTCTCCCT
GAGGACAAGG CTGGGAAGGC GAATGGCCTA TGGACAGGCG GAAAGAGGGA
4851 TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC
AGCCCTTCGC ACCGCGAAG AGTATCGAGT GCGACATCCA TAGAGTCAAG
4901 GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCGTTT
CCACATCCAG CAAGCGAGGT TCGACCGGAC ACACGTGCTT GGGGGGCAAG
4951 AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAAC ATCGTCTTGA GTCCAACCG
TCGGGCTGGC GACGCGGAAT AGGCCATTGA TAGCAGAACT CAGGTTGGGC
5001 GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG
CATTCTGTGC TGAATAGCGG TGACCGTCGT CCGTGACCAT TGTCCTAATC
5051 CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA
GTCTCGCTCC ATACATCCGC CACGATGTCT CAAGAACTTC ACCACCGGAT
5101 ACTACGGCTA CACTAGAAG AACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA
TGATGCCGAT GTGATCTTCC TTGTCATAAA CCATAGACGC GAGACGACTT
5151 GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAAA
CGGTCAATGG AAGCCTTTTT CTCACCATC GAGAACTAGG CCGTTTGTTC
5201 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC
GGTGGCGACC ATCGCCACCA AAAAAACAA CGTTCGTCTG CTAATGCGCG
5251 AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA
TCTTTTTTTC CTAGAGTTCT TCTAGGAAAC TAGAAAAGAT GCCCCAGACT

```

FIG 4E

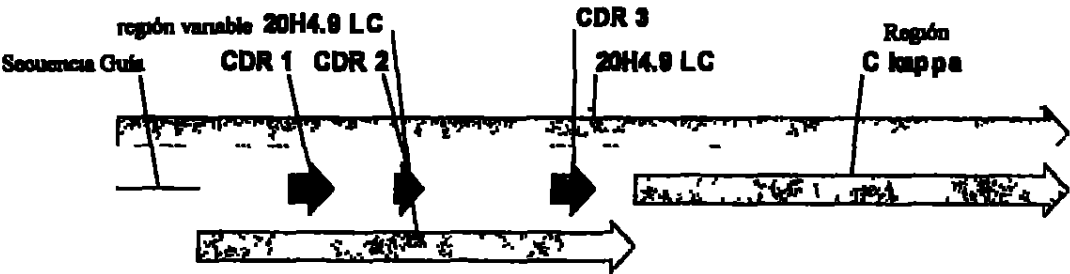
5301 CGCTCAGTGG AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT
GCGAGTCACC TTGCTTTTGA GTGCAATTCC CTAAAAQCAG TACTCTAATA
5351 CAAAAAGGAT CTTCACTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA
GTTTTTCCTA GAAGTGGATC TAGGAAAATT TAATTTTAC TTCAAAATTT
5401 TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT
AGTTAGATT CATATATACT CATTTGAACC AGACTGTCAA TGGTTACGAA
5451 AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG
T TAGTCACTC CGTGGATAGA GTCGCTAGAC AGATAAAGCA AGTAGGTATC
5501 TTGCCGTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA
AACGGAGTGA GGGGCAGCAC ATCTATTGAT GCTATGCCCT CCCGAATGGT
5551 TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC
AGACCGGGGT CACGACGTTA CTATGGCGCT CTGGGTGCGA GTGGCCGAGG
5601 AGATTTATCA GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG
TCTAAATAGT CGTTATTTGG TCGGTGCGCC TTCCCGGCTC GCGTCTTCAC
5651 GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA
CAGGACGTTG AAATAGGCGG AGGTAGGTCA GATAATTAAC AACGGCCCTT
5701 GCTAGAGTAA GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT
CGATCTCATT CATCAAGCGG TCAATTATCA AACGCGTTGC AACCAACGTA
5751 TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA
ACGATGTCCG TAGCACCACA GTGCGAGCAG CAAACCATAC CGAAGTAAGT
5801 GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC
CGAGGCCAAG GGTGCTAGT TCCGCTCAAT GTACTAGGGG GTACAACACG
5851 AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCTCTCC ATCSTTGTC GAAGTAAGTT
TTTTTTCCGC AATCGAGGAA GCCAGGAGGC TAGCAACAGT CTTCAATCAA
5901 GGCCGCGATG TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA
CCGGCGTCAC AATAGTGAGT ACCAATACCG TCGTGACGTA TTAAGAGAAT
5951 CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC
GACAGTACGG TAGGCATTCT ACGAAAAGAC ACTGACCACT CATGAGTTGG
6001 AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC
TTCAGTAAGA CTCTTATCAC ATACGCCGCT GGCTCAACGA GAACGGGCCG
6051 GTCAAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA
CAGTTATGCC CTATTATGGC GCGGTGTATC GTCTTGAAAT TTTCACGAGT
6101 TCATTGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG
AGTAACCTTT TGCAAGAAGC CCCGCTTTTG AGAGTTCTTA GAATGGCGAC
6151 TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAAC GATCTTCAGC
AACTCTAGGT CAAGCTACAT TGGGTGAGCA CGTGGGTGA CTAGAAGTCG
6201 ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA
TAGAAAATGA AAGTGGTCGC AAAGACCCAC TCGTTTTTGT CCTTCCGTTT
6251 ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA
TACGGCGTTT TTTCCCTTAT TCCCGCTGTG CCTTTACAAC TTATGAGTAT
6301 CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT
GAGAAGGAAA AAGTTATAAT AACTTCGTAA ATAGTCCCAA TAACAGAGTA
6351 GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT
CTCGCCTATG TATAAACTTA CATAAATCTT TTTATTTGTT TATCCCCAAG
6401 CGCGCACATT TCCCCGAAA GTGCCACCTG ACGTC
GCGCGTGTA AAGGGCTTTT CACGGTGGAC TGCAG

FIG 4F



20H4 9-IgG1 Cadena Pesada

FIG 5



20H4 9 Cadena Ligera

FIG 6

```

                                péptido guía Ig natural
                                ~~~~~
1  M K H L W F F L L L V A A P R W V
   ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT
   TACTTTGTGG ACACCAAGAA GGAGGAGGAC CACCGTCGAG GGTCTACCCA

                                ~~~~~
                                región variable 20H4 9 HC
                                ~~~~~
51 L S Q V Q L Q Q W G A G L L K P S
   CCTGTCCCAG GTGCAACTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT
   GGACAGGGTC CACGTTGATG TCGTCACCCC GCGTCTGAC AACTTCGGAA
                                CDR 1
                                ~~~

                                región variable 20H4 9 HC
                                ~~~~~
101 E T L S L T C A V Y G G S F S G
   CGGAGACCCT GTCCCTCACC TCGGCTGTCT ATGGTGGGTC CTTAGTGGT
   GCCTCTGGGA CAGGGAGTGG ACGCGACAGA TACCAOCCAG GAAGTCACCA
   CDR 1
   ~~~~~

                                región variable 20H4 9 HC
                                ~~~~~
151 Y Y W S W I R Q S P E K G L E W I
   TACTACTGGA GCTGGATACG CCAGTCCCCA GAGAAGGGGC TGGAGTGGAT
   ATGATGACCT CGACCTATGC GGTGAGGGGT CTCTTCCCCG ACCTCACCTA
   CDR 2
   ~~~~~

                                región variable 20H4 9 HC
                                ~~~~~
201 G E I N H G G Y V T Y N P S L E S
   TGGGGAAATC AATCATGGTG GATACGTCAC CTACAATCCG TCCCTCGAGA
   ACCCCTTTAG TTAGTACCAC CTATGCAGTG GATGTTAGGC AGGGAGCTCT
   CDR 2
   ~~~

                                región variable 20H4 9 HC
                                ~~~~~
251 R V T I S V D T S K N Q F S L K
   GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACCACTT CTCCCTGAAG
   CAGCTCAGTG GTATAGTCAT CTGTGCAGGT TCTTGGTCAA GAGGGACTTC
                                CDR 3
                                ~~~

                                región variable 20H4 9 HC
                                ~~~~~
301 L S S V T A A D T A V Y Y C A R D
   CTGAGCTCTG TGACCCCGCG GGACACGGCT GTATATTACT GTCCGAGGGA
   GACTCGAGAC ACTGGCGGCG CCTGTGCCGA CATATAATGA CACGCTCCCT
   CDR 3
   ~~~~~

                                región variable 20H4 9 HC
                                ~~~~~
351 Y G P G N Y D W Y F D L W G R G T
   CTATGGTCCG GGAATTATG ACTGGTACTT CGATCTCTGG GGCCGTGGCA
   GATACCAGGC CCCTTAATAC TGACCATGAA GCTAGAGACC CCGGCACCGT

```

FIG 7A

```

                                dominio CH1 IgG1
                                ~~~~~
región variable 20H4 9 HC
~~~~~
  L V T V S S A S T K G P S V F P
401 CCCTGGTCAC TGTCTCCTCA GCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC
    GGGACCAGTG ACAGAGGAGT CGGAGGTGGT TCCCGGGTAG CCAGAAGGGG
                                dominio CH1 IgG1
                                ~~~~~
  L A P S S K S T S G G T A A L G C
451 CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG
    GACCGTGGGA GGAGGTTCTC GTGGAGACCC CCGTGTGCGC GGGACCCGAC
                                dominio CH1 IgG1
                                ~~~~~
  L V K D Y F P E P V T V S W N S G
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCAGT GACGGTGTGCG TGGAACTCAG
    GGACCAGTTC CTGATGAAGG GGCTTGGCCA CTGCCACAGC ACCTTGAGTC
                                dominio CH1 IgG1
                                ~~~~~
  A L T S G V H T F P A V L Q S S
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCTCTA
    CGCGGGACTG GTCGCCGCAC GTGTGGAAGG GCCGACAGGA TGTCAAGAGT
                                dominio CH1 IgG1
                                ~~~~~
  G L Y S L S S V V T V P S S S L G
601 GGACTCTACT CCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
    CCTGAGATGA GGGAGTCGTC GCACCACTGG CACGGGAGGT CGTCGAACCC
                                dominio CH1 IgG1
                                ~~~~~
  T Q T Y I C N V N H K P S N T K V
651 CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
    GTGGGTCTGG ATGTAGACGT TGCACITAGT GTTCGGGTCG TTGTGGTTCC
IgG1 CH1 domain
~~~~~
                                región constante IgG1
                                ~~~~~
  D K R V E P K S C D K T H T C P
701 TGGACAAGAG AGTTGAGCCC AAATCTTGTG ACAAAACTCA CACATGCCCA
    ACCTGTTCTC TCAACTCGGG TTAGAACAC TGTTTTGAGT GTGTACGGGT
                                dominio CH2 IgG1
                                ~~~~~
región constante IgG1
~~~~~
  P C P A P E L L G G P S V F L F P
751 CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
    GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG
                                dominio CH2 IgG1
                                ~~~~~
  P K P K D T L M I S R T P E V T C
801 CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
    GGGTTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA

```

FIG 7B

```

dominio CH2 IgG1
-----
      V V V   D V S   E E D P   E V K   F N W
851  GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
      CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG GACTCCAGTT CAAGTTGACC
dominio CH2 IgG1
-----
      Y V D G   V E V   H N A   K T K P   R E E
901  TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
      ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT
dominio CH2 IgG1
-----
      Q Y N   S T Y R   V V S   V L T   V L H Q
951  GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
      CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAAGT GCAGGAGTGG CAGGACGTGG
dominio CH2 IgG1
-----
      D W L   N G K   E Y K C   K V S   N K A
1001 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAGGCC
      TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA CGTCCAGAG GTTGTTCGG
dominio CH3 IgG1
-----
dominio CH2 IgG1
-----
      L P A P   I E K   T I S   K A K G   Q P R
1051 CTCCAGCCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
      GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC
dominio CH3 IgG1
-----
      E P Q   V Y T L   P P S   R D E   L T K N
1101 AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
      TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG GGCCCTACTC GACTGGTTCT
dominio CH3 IgG1
-----
      Q V S   L T C   L V K G   F Y P   S D I
1151 ACCAGGTGAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
      TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAAGTTT CGAAGATAGG GTCGCTGTAG
dominio CH3 IgG1
-----
      A V E W   E S N   G Q P   E N N Y   K T T
1201 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC AACAAGACCAC
      CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC CTCTTGTGTA TGTTCGTGGT
dominio CH3 IgG1
-----
      P P V   L D S D   G S F   F L Y   S K L T
1251 GOCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA
      CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA GAAGGAGATG TCGTTCGAGT
dominio CH3 IgG1
-----
      V D K   S R W   Q Q G N   V F S   C S V
1301 COGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
      GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCTT TGCAGAAGAG TACGAGGCAC

```

FIG 7C

dominio CH3 IgG1

M H E A L E N E Y T Q K S L S L S
1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC GTCTTCTCGG AGAGGGACAG
dominio CH3 IgG1

P G K
1401 CCCGGGTAAA TGA
GGGCCCATTT ACT

FIG 7D

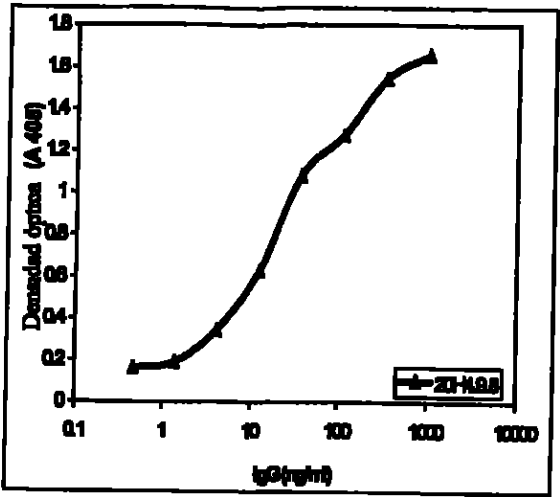


FIG 8A

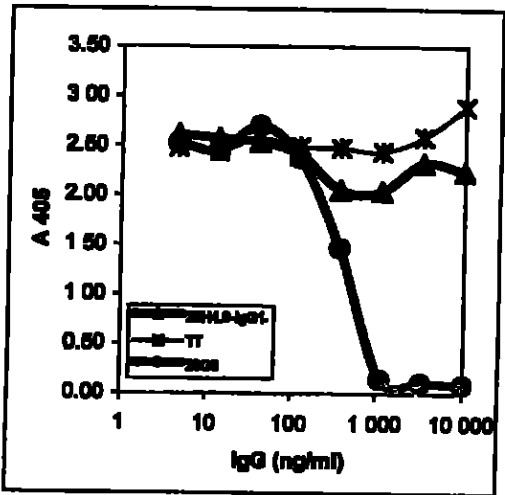


FIG 8B

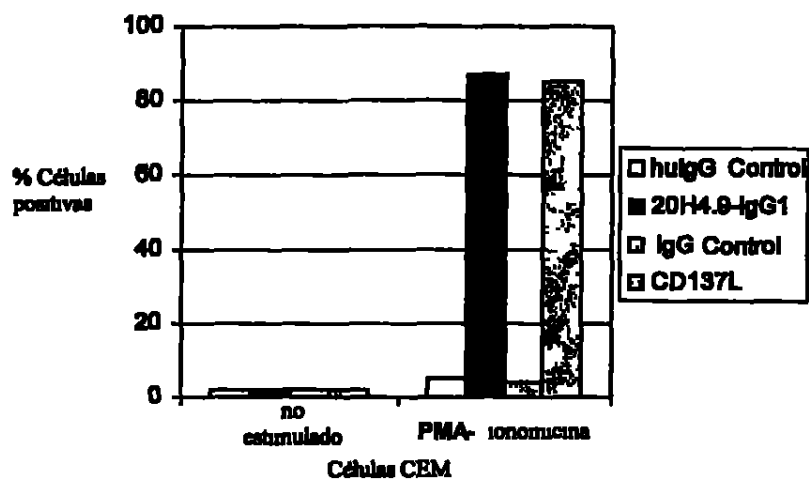


FIG 9A

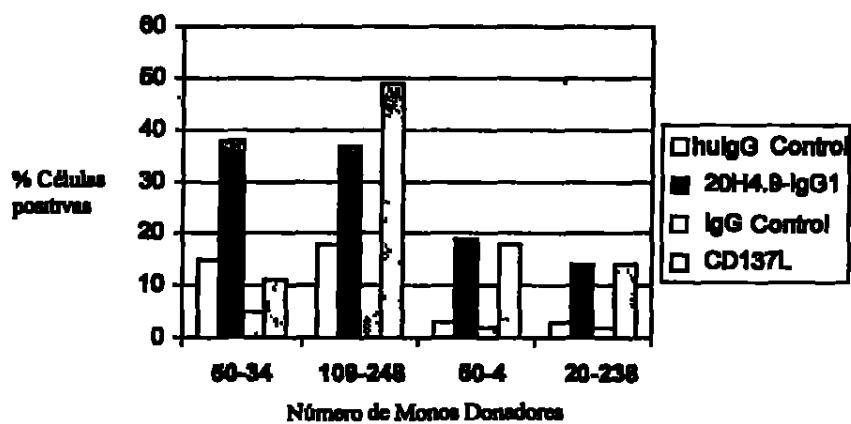


FIG 9B

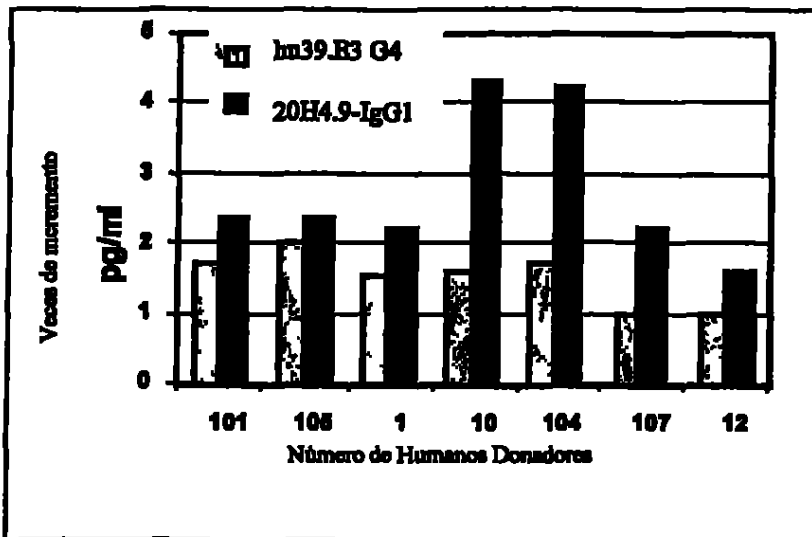


FIG 10A

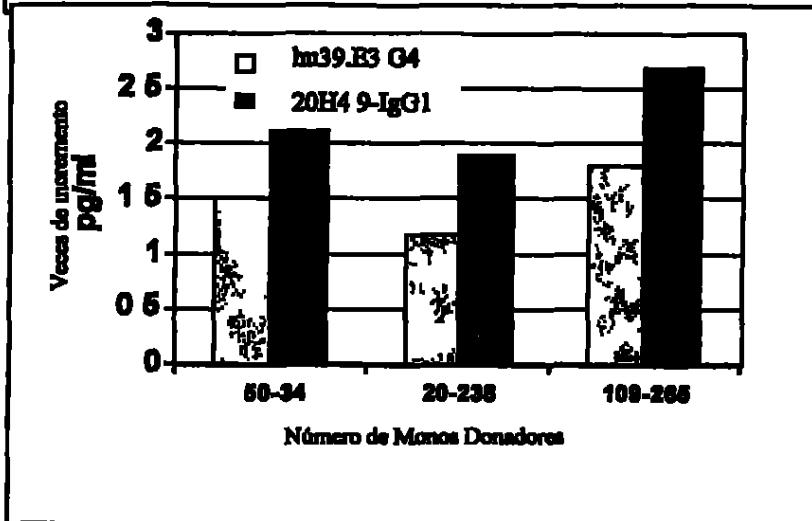


FIG 10B

170
125

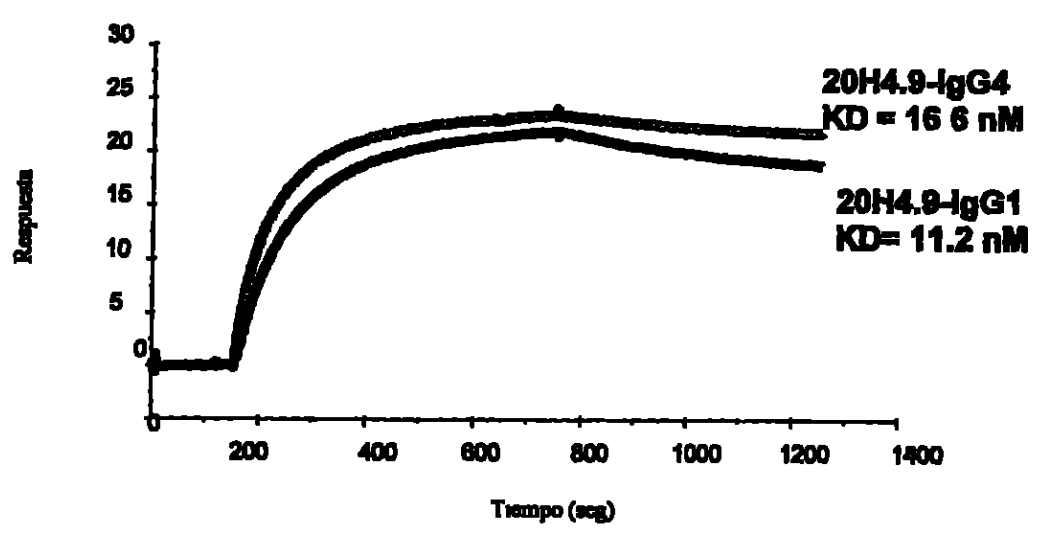


FIG 11

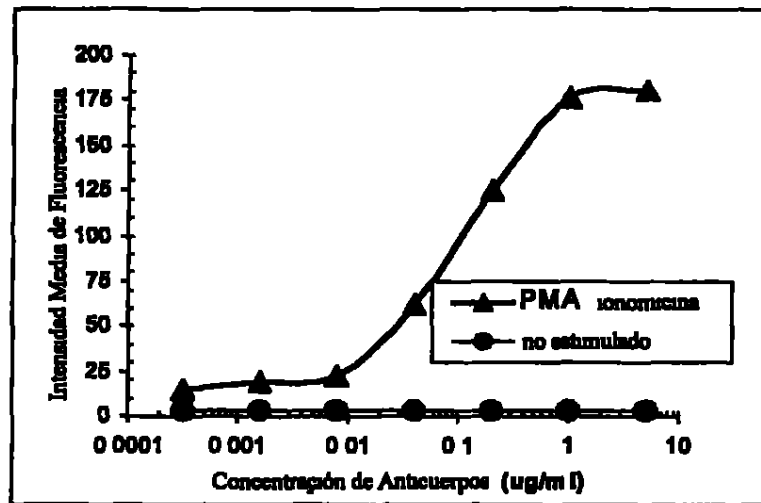


FIG 12

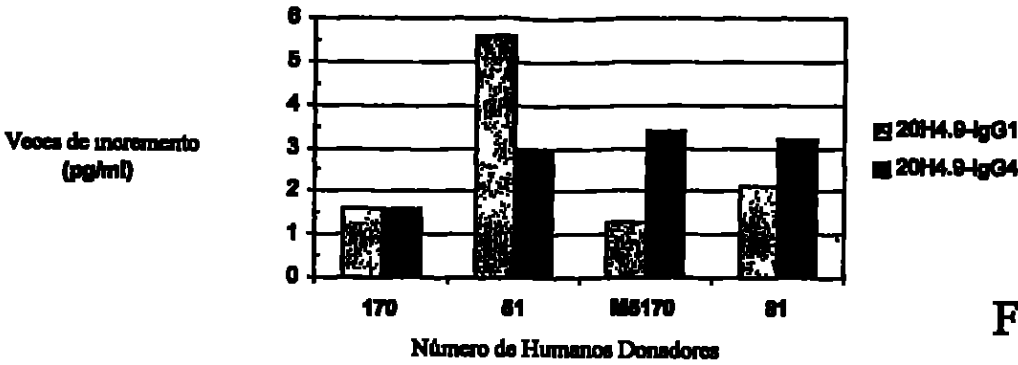


FIG 13A

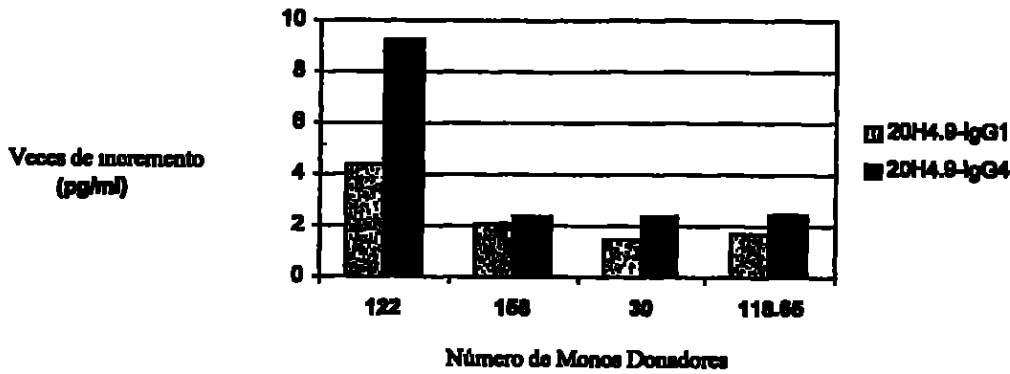


FIG 13B

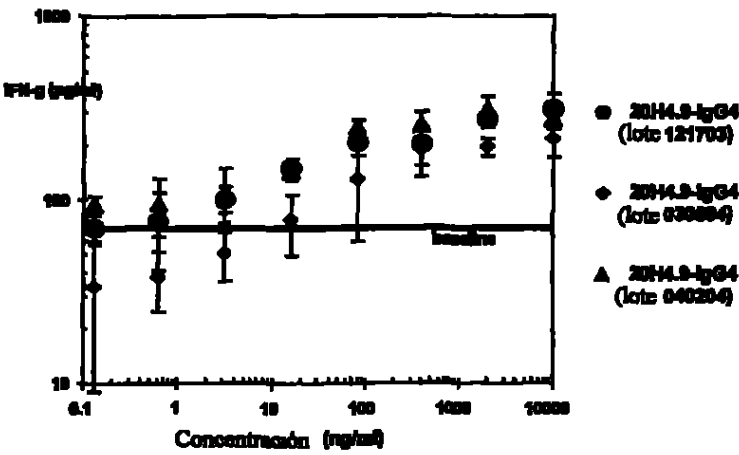


FIG 14A

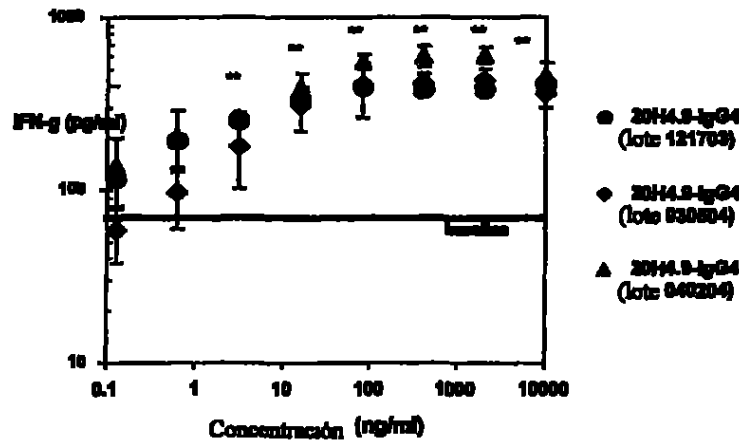


FIG 14B

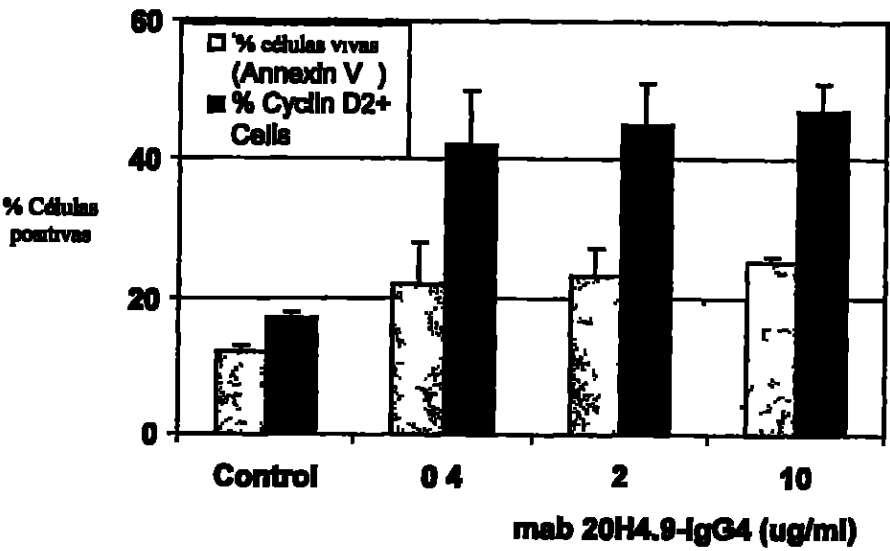


FIG 15

FIG 16A

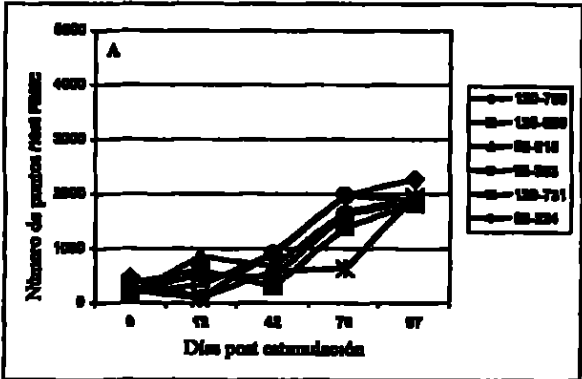


FIG 16B

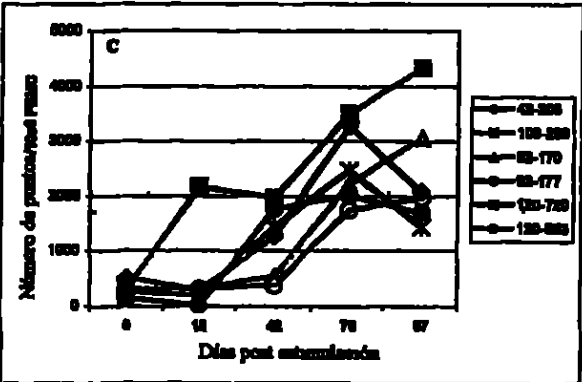
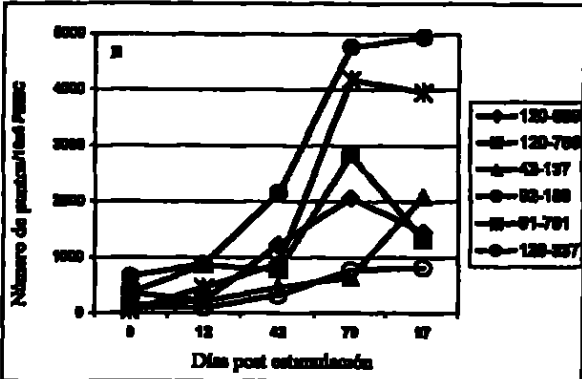


FIG 16C

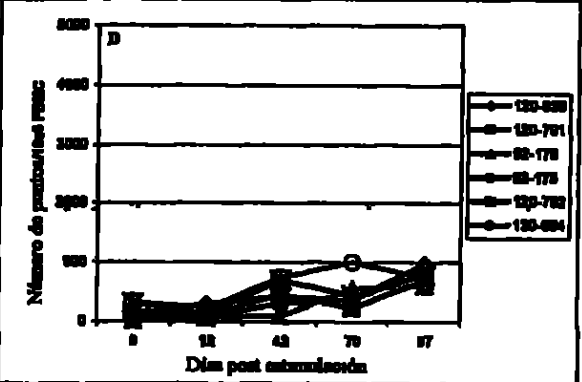


FIG 16D

PATENT COOPERATION TREATY

10060-WO-PCT
181

PCT

COMMUNICATION IN CASES FOR WHICH
NO OTHER FORM IS APPLICABLE

From the INTERNATIONAL BUREAU

To

GOLIAN Paul D
Bristol Myers Squibb Company
P O Box 4000
Princeton NJ 08543-4000
ETATS UNIS D AMERIQUE

181

Date of mailing (day/month/year) 12 December 2005 (12 12 2005)	
Applicant's or agent's file reference 10060 PCT	REPLY DUE see paragraph 1 below
International application No PCT/US2004/033587	International filing date (day/month/year) 12 October 2004 (12 10 2004)
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY	

- 1
- ☐ REPLY DUE within _____ months/days from the above date of mailing
- ☐ NO REPLY DUE, however see below
- ☒ IMPORTANT COMMUNICATION
- ☐ INFORMATION ONLY

2 COMMUNICATION

The International Bureau acknowledges receipt of your telefax dated 02 December 2005 (02 12 2005) concerning the publication of the above identified international application. Please be informed that the question mark after the name appeared due to a technical problem which is now resolved. A corrected version of the pamphlet cover page will be republished in due course.

Please apologize for any inconvenience caused.

RECEIVED
BMS PATENT LAW

DEC 21 2005

Docketed Item _____
Due Date _____
Attorney _____

(P2)

The International Bureau of WIPO 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20 Switzerland	Authorized officer Tessadel PAMPLIEGA (Fax 338-87 20)
Facsimile No (41 22) 338 87.20	Telephone No (41 22) 338 96 78

PATENT COOPERATION TREATY

783
182

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis 1 and
Administrative Instructions Section 422)

To

GOLIAN Paul D
Bristol Myers Squibb Company
P O Box 4000
Princeton NJ 08543-4000
United States of America

Date of mailing (day/month/year)

12 December 2005 (12 12 2005)

Applicant's or agent's file reference

10060 PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US2004/033587

International filing date (day/month/year)

12 October 2004 (12 10 2004)

1 The following indications appeared on record concerning

☐ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

HALK Edward L
1004 Edmonds Court
Sunnyvale CA 94087
United States of America

State of Nationality

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and inventor for all designated States

4. A copy of this notification has been sent to

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41 22) 338.87 20

Authorized officer

Tessadei PAMPLIEGA (Fax 338-87 20)

Telephone No. (41 22) 338 8678

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/033587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal WPI Data BIOSIS PAJ EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	WO 98/16249 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 23 April 1998 (1998-04-23) abstract	1-10
Y	WO 96/29348 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 26 September 1996 (1996-09-26) abstract	1-10
Y	WO 2004/055513 A (SCHWARZ HERBERT WITTMANN MARGARETHE) 1 July 2004 (2004-07-01) abstract	1-10
Y	WO 2004/010947 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY JURE-KUNKEL MARIA GANGULY SUBINAY AB) 5 February 2004 (2004-02-05) abstract	1-10
	— — — — — -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

Special categories of cited documents

- A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- E* earlier document but published on or after the international filing date
- L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)
- O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- & document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 2005

Date of making of the international search report

01/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentplan 2
NL 2280 HV Rijswijk
Tel (31 70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31 70) 340-3016

Authorized officer

Lechner O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/033587

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	WO 03/084999 A (LEIDEN UNIVERSITY MEDICAL CENTER DIEHL LINDA VAN MIERLO GEERTJE M) 16 October 2003 (2003-10-16) abstract	1-10
A	LOO D T ET AL Analysis of 4-1BB and laminin binding to murine 4-1BB a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and comparison with human 4-1BB THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 7 MAR 1997 vol 272 no 10 7 March 1997 (1997-03-07) pages 6448-6456 XP002316895 ISSN 0021-9258 abstract page 6452 left-hand column paragraph 2 - right-hand column paragraph 1	1-10
A	YE ZHENGMAO ET AL Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB NATURE MEDICINE APR 2002 vol 8 no 4 April 2002 (2002-04) pages 343-348 XP002316896 ISSN 1078-8956 abstract	1-10

786
185

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2004/033587

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9816249 A	23-04-1998	AU 738981 B2	04-10-2001
		AU 4747097 A	11-05-1998
		BR 9712278 A	31-08-1999
		CA 2268340 A1	23-04-1998
		CN 1232402 A	20-10-1999
		EP 0948353 A1	13-10-1999
		HU 9904697 A2	28-08-2000
		JP 2001502325 T	20-02-2001
		KR 2000049045 A	25-07-2000
		NO 991676 A	09-04-1999
		NZ 334691 A	22-12-2000
		PL 332699 A1	27-09-1999
		RU 2192281 C2	10-11-2002
		WO 9816249 A1	23-04-1998
		US 6210669 B1	03-04-2001
WO 9629348 A	26-09-1996	AU 5369996 A	08-10-1996
		US 6303121 B1	16-10-2001
		WO 9629348 A1	26-09-1996
		US 6569997 B1	27-05-2003
		US 2004091476 A1	13-05-2004
WO 2004055513 A	01-07-2004	WO 2004055513 A2	01-07-2004
WO 2004010947 A	05-02-2004	WO 2004010947 A2	05-02-2004
		US 2004105855 A1	03-06-2004
WO 03084999 A	16-10-2003	US 2003118588 A1	26-06-2003
		AU 2003225431 A1	20-10-2003
		CA 2480162 A1	16-10-2003
		EP 1490407 A1	29-12-2004
		WO 03084999 A1	16-10-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/033587

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons.

- 1 ☒ Claims Nos.
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority namely
Although claim 6 is directed to a method of treatment of the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition
- 2 ☐ Claims Nos.
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically
- 3 ☐ Claims Nos.
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows.

- 1 ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
- 2 ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee this Authority did not invite payment of any additional fee
- 3 ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.
- 4 ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud Internacional
PCT/US2004/033587

A. CLASIFICACION DEL ASUNTO RELACIONADO
IPC 7 C07K16/28

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC), tanto la clasificación nacional como la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación utilizada buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación)

IPC 7 C07K

Documentación buscada diferente de la documentación misma, el grado que estos documentos se unifican en los campos buscados.

Base de datos, electrónica, consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, donde se puede practicar términos de búsqueda usados).

EPO-Internal WPI Data BIOSIS PAJ EMBL

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES

Categoría	Clasificación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los parajes pertinentes	Pertinente para la reivindicación No.
Y	WO 98/16249 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 23 Abril 1998 (1998-04-23) resumen -----	1-10
Y	WO 96/29348 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 26 Septiembre 1996 (1996 09-26) resumen ---	1-10
Y	WO 2004/055513 A (SCHWARZ HERBERT WITTMANN MARGARETHE) 1 Julio 2004 (2004-07-01) resumen ----	1-10
Y	WO 2004/010947 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY JURE-KUNKEL MARIA GANGULY SUBINAY AB) 5 Febrero 2004 (2004-02-05) resumen ----- -/-	1-10



Documentos adicionales se listan en la continuación del cuadro C.



Los miembros de la familia de patentes se listan en el cuadro

Categoría especial de los documentos citados

A	Documento que define el estado general de la técnica, que no se considera que es de pertinencia particular	T	documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional, la fecha de prioridad, y que no provoca conflicto con la solicitud, pero se cita para entender el principio, tanto que toda la invención documentada de pertinencia particular la invención reivindicada no se puede considerar nueva, no se puede considerar que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo
E	Documento anterior pero publicado en después de la fecha de presentación internacional	X	
L	Documento que pueda crear dudas de la reivindicación(es) de prioridad que se cita para establecer la fecha de publicación de otra situación, otra razón especial (como se especifica)	Y	documento de pertinencia particular la invención reivindicada no se puede considerar que comprende un paso inventivo cuando el documento se establece con uno solo de estos documentos, estas combinaciones son obvias para una persona experta en la técnica
O	Documento que se refiere una descripción oral, uso, exhibición, otro medio	Z	documento miembro de la familia de patentes
P	Documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero después de la fecha de prioridad reivindicada		

Fecha de la actual terminación de la búsqueda internacional
1 de Marzo de 2005

Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional
01/04/2005

Nombre y dirección de envío ISA
Oficina Europea de Patentes P.B. 5818 Patendreeen 2
NL 2280 HV Rijswijk
Tel (31 70) 340-2040 Tx. 31 651 epo nl,
Fax (31 70) 340-3016

Funcionario autorizando

Lechner O

Forma PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio de 1992)

Página 1 de

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

SOLICITUD INTERNACIONAL No
PCT/US2004/033587

C (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Documentos citados con indicación al procede de los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación No.
Y	WO 03/084999 A (LEIDEN UNIVERSITY MEDICAL CENTER DIEHL LINDA VAN MIERLO GEERTJE M) 16 Octubre 2003 (2003-10-16) resumen -----	1-10
A	L00 D T ET AL "Análisis of 4-1BBL and laminin binding to murine 4-1BB a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and comparison with human 4-1BB " THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 7 MAR 1997 Vol 272 no 10 7 Marzo 1997 (1997-03-07) páginas 6448-6456 XP002316895 SIN 0021-9258 Resumen Página 6452 columna mano-izquierda párrafo 2 - columna mano-derecha párrafo 1 -----	1-10
A	YE ZHENGMAO ET AL "Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB " NATURE MEDICINE Abril 2002 Vol 8 no 4 Abril 2002 (2002-04) páginas 343-348 XP00231696 ISSN 1078-8956 resumen -----	1-10

Forma PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (Julio de 1992)

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No de solicitud internacional
PCT/US2004/033587

Documento de patente citado en el Reporte de Búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patente(s)	Fecha de publicación
WO 9816249	A	23-04-1998	AU 738981 B2 04-10-2001
		AU 4747097 A	11-05-1998
		BR 9712278 A	31-08-1999
		CA 2268340 A1	23-04-1998
		CN 1232402 A	20-10-1999
		EP 0948353 A1	13-10-1999
		HU 9904697 A2	28-08-2000
		JP 2001502325 T	20-02-2001
		KR 2000049045 A	25-07-2000
		NO 991676 A	09-04-1999
		NZ 334691 A	22-12-2000
		PL 332699 A1	27-09-1999
		RU 2192281 C2	10-11-2002
		WO 9816249 A1	23-04-1998
		US 6210669 B1	03-04-2001
WO 9629348	A	26-09-1996	AU 5369996 A 08-10-1996
		US 6303121 B1	16-10-2001
		WO 9629348 A1	26-09-1996
		US 6569997 B1	27-05-2003
		US 2004091476 A1	13-05-2004
WO 2004055513	A	01-07-2004	WO 2004055513 A2 01-07-2004
WO 2004010947	A	05-02-2004	WO 2004010947 A2 05-02-2004
		US 2004105855 A1	03-06-2004
WO 03084999	A	16-10-2003	US 2003118588 A1 26-06-2003
		AU 2003225431 A1	20-10-2003
		CA 2480162 A1	16-10-2003
		EP 1490407 A1	29-12-2004
		WO 03084999 A1	16-10-2003

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No de solicitud internacional
PCT/US2004/033587

Bloque I Observaciones en donde ciertas reivindicaciones se encontraron no pudieron ser investigadas (Continuación del ítem 1 de la primera hoja)

Este reporte internacional no ha sido establecido con respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2) del PCT por las siguientes razones.

- ☒ Reivindicaciones Nos
debido a que se relacionan con temas que no requieren ser buscados por esta Autoridad a saber

Aun cuando la reivindicación 6 está dirigida a un método de tratamiento de cuerpos humanos/animal la búsqueda ha sido llevada a cabo y en base a los alegatos efectuados del compuesto/composición
- ☐ Reivindicaciones Nos
debido a que se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requerimientos prescritos a tal extensión que ninguna búsqueda internacional significativa se pueda llevar a cabo, específicamente
- ☐ Reivindicaciones Nos.
debido a que son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de acuerdo con las segundas y terceras oraciones de la Regla 6.4(e)

Bloque II Observaciones en donde se carece de unidad de la invención (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

La Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples invenciones en esta solicitud internacional como sigue
Ver página adicional

- ☐ Ya que todas las cuotas de búsqueda adicionales fueron pagadas a tiempo por la solicitante, este reporte de búsqueda cubre todas las reivindicaciones que se pudieron investigar
- ☐ Ya que todas las reivindicaciones que se pudieron investigar pudieron ser buscadas sin esfuerzo que justifique una cuota adicional, esta Autoridad no invita al pago de ninguna cuota adicional
- ☐ Ya que solamente algunas de las cuotas de búsqueda adicionales requeridas fueron pagadas oportunamente por la solicitante este reporte de búsqueda internacional cubre solamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron cuotas, específicamente las reivindicaciones Nos.
- ☐ Ninguna cuota de búsqueda adicional requerida fue pagada oportunamente por la solicitante. Consecuentemente este reporte de búsqueda internacional está restringido a la invención primero mencionada en las reivindicaciones está cubierta por las reivindicaciones Nos.

Observación en protesta

☐ Las cuotas de búsqueda adicionales estuvieron acompañadas por la protesta de la solicitante
☐ Ninguna protesta acompañó el pago de las cuotas de búsqueda adicional.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US04/033587

10060-WO-PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

GOLIAN Paul, D
Bristol-Myers, Squibb, Company
P O Box 4000
Princeton NJ 08543-2081
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

DEC 20 2004

Registered Item
Due Date
Attorney

Date of mailing (day/month/year) 07 December 2004 (07 12 2004)	
Applicant's or agent's file reference 10060 PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US04/033587	International filing date (day/month/year) 12 October 2004 (12 10 2004)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 10 October 2003 (10 10 2003)
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY et al	

1 By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR" in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17 1(a) or (b).

2 (If applicable) The letters NR appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17 1(a) or (b). Where, under Rule 17 1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule the attention of the applicant is directed to Rule 17 1(e) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3 (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17 1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17 1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17 1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17 1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17 1(e) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity upon entry into the national phase to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date

Priority application No.

Country or regional Office
or PCT receiving OfficeDate of receipt
of priority document10 October 2003 (10 10 2003)
08 October 2004 (08 10 2004)

60/510 193

US
US22 November 2004 (22 11 2004)
NRThe International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland

Authorized officer

Craker Alexander

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 87 20
Telephone No. +41 22 338 8348

PATENT COOPERATION TREATY 10060-WO-PCT

Golian 192

PCT

NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis 1 and 26bis 2 and
Administrative Instructions Sections 402(c) and 409)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To

RECEIVED

BMS PATENT LAW

GOLIAN Paul D
Bristol Myers Squibb Company
P O Box 4000
Princeton NJ 08541-4000
United States of America
MAR 11 2005
Docketed Item
Due Date
Attorney

Date of mailing (day/month/year)

02 March 2005 (02 03 2005)

Applicant's or agent's file reference

10060 PCT

International application No.

PCT/US2004/033587

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

12 October 2004 (12 10 2004)

Applicant

BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY et al

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application

- 1 ☒ **Correction of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on 28 December 2004 (28 12 2004) the following priority claim has been corrected according to paragraph 178 of the PCT Receiving Guidelines where application, to read as follows

US 08 October 2004 (08 10 2004) 10/961 567

- ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:

- 2 ☐ **Addition of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on the following priority claim has been added

- ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document

- 3 ☐ As a result of the correction and/or addition of (s) priority claim(s) under items 1 and/or 2 the (earliest) priority date is

- 4 ☐ **Priority claim considered not to have been made.**

- ☐ The applicant failed to respond to the invitation under Rule 26bis.2(a) (Form PCT/IB/316) within the prescribed time limit.
☐ The applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a).
☐ The applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10

The applicant may before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee request the International Bureau to publish together with the international application information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(c) and the PCT Applicant's Guide Volume I, Annex B2(1B)

- 5 ☐ Where multiple priorities have been claimed the above item(s) relate(s) to the following priority claim(s)

- 6 A copy of this notification has been sent to the receiving Office and

- ☒ to the International Searching Authority (where the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have not yet been issued)
☐ the designated Offices (in accordance with Rule 93bis)

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41 22) 338.87 20

Authorized officer

Beatriz LARGO (Fax 338-87 20)

Telephone No (41-22) 338 9572

PATENT COOPERATION TREATY

Golian

From the RECEIVING OFFICE

To
PAUL D GOLIAN
BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY
P O BOX 4000
PRINCETON NEW JERSEY 08543-4000

PCT - 193

May

NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis 1 and 26bis 2 and Administrative Instructions, Sections 302 and 314)

Date of mailing (day/month/year) **10 MAR 2005**

Applicant's or agent's file reference
10060 PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2004/033587

International filing date (day/month/year)
12 Oct 2004

Applicant
BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application

- 1 ☒ Correction of priority claim. In accordance with the applicant's notice received on 28 Dec 2004 the following priority claim has been corrected to read as follows:
2nd priority claim is US 10/061 567 filed 08 Oct 2004
☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document.
- 2 ☐ Addition of priority claim. In accordance with the applicant's notice received on _____ the following priority claim has been added.
☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document.
- 3 ☐ As a result of the correction and/or addition of (a) priority claim(s) under items 1 and/or 2 the (earliest) priority date is.
- 4 ☐ The priority claim (see also item 5 below if applicable) is considered not to have been made because
☐ the applicant failed to respond to the invitation under Rule 26bis 2(a) (Form PCT/RO/110) within the prescribed time limit.
☐ the applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis 1(c).
☐ the applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4 10.
The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis 2(c) and the PCT Applicant's Guide Volume I Annex B2(1B).
- 5 ☐ In case where multiple priorities have been claimed, the above item(s) relate to the following priority claim(s)
- 6 A copy of this notification has been sent to the International Bureau and ☒ to the International Searching Authority

Name and mailing address of the receiving Office
Mail Stop PCT Commissioner for Patents
P O Box 1450, Alexandria, VA 22313 1450
Facsimile No. 703 305-3230

Authorized officer
Nhu Thuy Tran
Telephone No. 703 308-9200

RECEIVED
BMS PATENT LAW

MAR 14 2005

Docketed Item _____
Due Date _____
Attorney _____

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

RECEIVED**BMS PATENT LAW**GOLIAN Paul D.
Bristol-Myers Squibb Company
P O Box 4000
Princeton NJ 08543-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

APR 04 2005

Docketed Item

Due Date

Attorney

Date of mailing (day/month/year) 24 March 2005 (24.03.2005)	
Applicant's or agent's file reference 10080 PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US04/033587	International filing date (day/month/year) 12 October 2004 (12 10.2004)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 10 October 2003 (10 10.2003)
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY et al	

- 1 By means of this Form which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR" in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17 1(a) or (b).
- 2 (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17 1(a) or (b). Where, under Rule 17 1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17 1(e) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- 3 (If applicable) An asterisk () appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17 1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17 1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17 1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17 1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17 1(e) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
10 October 2003 (10 10.2003)	60/510 193	US	22 November 2004 (22.11.2004)
08 October 2004 (08 10.2004)	10/661 587	US	11 March 2005 (11 03 2005)

The International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Authorized officer

Griff Schmitt Beate

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Telephone No. +41 22 338 9241

195
+196

Docket No 10060 PCT

PATENT COOPERATION TREATY

International Application No PCT/US2004/033587
International Filing Date 12 October 2004
Priority Date 10 October 2003
Applicant Bristol Myers Squibb Company et al
For FULLY HUMAN ANTIBODIES TO HUMAN 4 1BB

International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland
Facsimile (41 22) 740 1435 or
Facsimile (41 22) 910 06 10

92 BIS CHANGE

SIR

Please amend the records in the above international application to reflect the addition of the following applicant/inventor Edward L Halk Enclosed is a Power of Attorney duly executed by Edward L Halk

Please note that the 30 month priority date is April 10 2006 Accordingly we would appreciate it if the change was recorded before that date Please issue form PCT/IB/306 and forward it to us as soon as possible

Respectfully submitted

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

By


Paul D Golian
Attorney Agent for Applicants
Reg No 42 591
P O Box 4000
Princeton New Jersey 08543-4000
Telephone (609) 252 4091

Dated 02 December 2005

cc PCT Operations
Via facsimile - 571 273 3201

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for an international application filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.4)

The undersigned applicant(s) (Names should be indicated as they appear in the request)

HALK Edward L
1004 Edmonds Court
Sunnyvale CA 94087
UNITED STATES OF AMERICA

hereby appoints (appoint) the following person as

☐

agent

☒

common representative

Name and address

(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
Route 206 and Province Line Road
Princeton New Jersey 08543
United States of America

to represent the undersigned before

☒

all the competent International Authorities

☐

the International Searching Authority only

☐

the International Preliminary Examining Authority only

in connection with the international application identified below

Title of the invention Fully Human Antibodies Against Human 4-1BB

Applicant's agent's file reference 10080

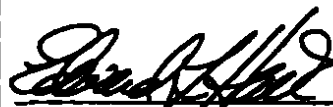
International application number (if already available) PCT/US2004/033587

filed with the following Office United States

as receiving Office

and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

Signature of the applicant(s) (where there are several applicants, each of them must sign, next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs, if such capacity is not obvious from reading the request or this power)



Edward L. Halk

Date. 10/20/05

148
197

Auto-Reply Facsimile Transmission



TO

Fax Sender at 6092524526

Fax Information

Date Received

Total Pages

12/2/2005 2 25 11 PM [Eastern Standard Time]

2 (Including cover page)

ADVISORY This is an automatically generated return receipt confirmation of the facsimile transmission received by the Office. Please check to make sure that the number of pages listed as received in Total Pages above matches what was intended to be sent. Applicants are advised to retain this receipt in the unlikely event that proof of this facsimile transmission is necessary. Applicants are also advised to use the certificate of facsimile transmission procedures set forth in 37 CFR 1.8(a) and (b) 37 CFR 1.6(f). Trademark Applicants also see the Trademark Manual of Examining Procedure (TMPE) section 306 et seq.

Received
Cover
Page

=====>

DEC 2 2005 2 24 PM BUREAU OF PATENT

12 592 71

Docket No. 10060 PCT

PATENT COOPERATION TREATY

International Application No. PCT/US2004/033587
International Filing Date 13 October 2004
Priority Date 10 October 2003
Applicant Bristol-Myers Squibb Company et al.

For FULLY HUMAN ANTIBODIES TO HUMAN 4-1BB

International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile: (41-22) 740 1435 or
Facsimile: (41-22) 910 06 10

RECEIVED

SIR,

Please amend the records in the above international application to reflect the addition of the following applicant's name, Edward L. Hall. Enclosed is Power of Attorney duly executed by Edward L. Hall.

Please note that the 30-month priority date is April 10, 2006. Accordingly, we would appreciate it if the change was recorded before that date. Please issue form PCT/IB/306 and forward it to us as soon as possible.

Respectfully submitted,

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

By 
Paul D. Gellin
Attorney, Agent for Applicants
Reg. No. 42,591
P.O. Box 4008
Princeton, New Jersey 08543-4008
Telephone (609) 252-4081

Dated, 02 December 2005

see PCT Operations
Via Facsimile 571-273-1201

FAX HEADER 1 BMS PATENT DEPT
FAX HEADER 2

3992 MEMORY TX

USPTO

OK

2/2

Docket No 10060 PCT

International Application No	PCT/US2004/033587
International Filing Date	12 October 2004
Priority Date	10 October 2003
Applicant	Bristol Myers Squibb Company et al

For FULLY HUMAN ANTIBODIES TO HUMAN 4-1BB

International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland
Facsimile (41 22) 740 1435 or
Facsimile (41 22) 910 06 10

SDR

Please amend the records in the above international application to reflect the addition of the following applicant/inventor Edward L. Halk. Enclosed is a Power of Attorney duly executed by Edward L. Halk.

Please note that the 30-month priority date is April 10 2006. Accordingly we would appreciate it if the change was recorded before that date. Please issue form PCT/IB/306 and forward it to us as soon as possible.

Respectfully submitted,

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

By Paul D Gollan
Attorney Agent for Applicants
Reg. No 42,591
P O Box 4000
Princeton, New Jarney 08543-4000
Telephone (609) 252 4091

Dated 02 December 2005

cc PCT Operations
Via facsimile - 571 273 3201

199
P 1

* * * COMMUNICATION RESULT REPORT (DEC 2 2005 2 24PM) * *

FAX HEADER 1 BMS PATENT DEPT
FAX HEADER 2

TRANSMITTED/STORED FILE MODE	DEC 2 2005 2 22PM OPTION	ADDRESS	RESULT	PAGE
3991 MEMORY TX		41 22 338 89 20	OK	2/2

A ON 1-3} 0 8 0 w 0 A [-2} 0 Y AC M 0 0

Docket No 10060 PCT

PATENT COOPERATION TREATY

International Application No PCT/US2004/033587
International Filing Date 12 October 2004
Priority Date 10 October 2003
Applicant Bristol Myers Squibb Company et al
For FULLY HUMAN ANTIBODIES TO HUMAN 4-1BB

International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland
Facsimile (41-22) 740 1435 or
Facsimile (41-22) 910 06 10

92 BIS CHANGE

SIR.

Please amend the records in the above international application to reflect the addition of the following applicant/inventor Edward L. Halk. Enclosed is a Power of Attorney duly executed by Edward L. Halk.

Please note that the 30-month priority date is April 10 2006. Accordingly we would appreciate it if the change was recorded before that date. Please issue form PCT/IB/306 and forward it to us as soon as possible.

Respectfully submitted,

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

By 
Paul D. Gollan
Attorney Agent for Applicants
Reg No 42,591
P O Box 4000
Princeton, New Jersey 08543-4000
Telephone (609) 252- 4091

Dated. 02 December 2005

cc PCT Operations
Via facsimile -- 571-273 3201

209
200

Docket No 10060 PCT

PATENT COOPERATION TREATY

International Application No PCT/US2004/033587
International Filing Date 12 October 2004
Priority Date 10 October 2003
Applicant Bristol Myers Squibb Company et al

For FULLY HUMAN ANTIBODIES TO HUMAN 4 1BB

International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland
Facsimile (41 22) 740 1435 or
Facsimile (41 22) 910 06 10

92 BIS CHANGE

SIR

Please amend the records in the above international application to correct the name of the applicant from Bristol Myers Squibb Company ? to Bristol Myers Squibb Company
The international application published with a ? after the applicant s name which needs to be removed

Please note that the 30-month priority date is April 10 2006 Accordingly we would appreciate it if the change was recorded before that date Please issue form PCT/IB/306 and forward it to us as soon as possible

Respectfully submitted,

BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY

By


Paul D Golian
Attorney Agent for Applicants
Reg No 42 591
P O Box 4000
Princeton New Jersey 08543-4000
Telephone (609) 252 4091

Dated 02 December 2005

cc PCT Operations
Via facsimile - 571 273 3201

202
201



Auto-Reply Facsimile Transmission



TO Fax Sender at 6092524528
Fax Information
Date Received 12/2/2005 2 22:30 PM [Eastern Standard Time]
Total Pages 1 (Including cover page)

ADVISORY This is an automatically generated return receipt confirmation of the facsimile transmission received by the Office. Please check to make sure that the number of pages listed as received in Total Pages above matches what was intended to be sent. Applicants are advised to retain this receipt in the unlikely event that proof of this facsimile transmission is necessary. Applicants are also advised to use the certificate of facsimile transmission procedures set forth in 37 CFR 1.8(a) and (b) 37 CFR 1.6(f). Trademark Applicants also see the Trademark Manual of Examining Procedure (TMEP) section 306 et seq.

Received
Cover
Page
=====>

DEC 2 2005 2 21 PM BPS AT-RT DEPT 10 565 /

Deskset No. 10000 PCT

PATENT COOPERATION TREATY

International Application No. PCT/US2004/033387
International Filing Date: 12 October 2004
Priority Date: 10 October 2003
Applicant: Bristol-Myers Squibb Company et al.

For FULLY HUMAN ANTIBODIES TO HUMAN 4-1BB

International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 26, Switzerland
Telephone: (41-22) 740 1435 or
Facsimile: (41-22) 910 66 10

RE: CHANGE

SIR:

Please amend the records in the above international application to correct the name of the applicant from Bristol-Myers Squibb Company 7 to Bristol-Myers Squibb Company. The international application published with 7 after the applicant names, which needs to be removed.

Please note that the 30-month priority date is April 10, 2006. Accordingly we would appreciate it if the change was recorded before that date. Please have form PCT/IB/306 and forward it to us as soon as possible.

Respectfully submitted,
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

By [Signature]
Paul D. Goffin
Attorney Agent for Applicants
Reg. No. 42,591
P.O. Box 4000
Princeton, New Jersey 08543-4000
Telephone: (609) 252-4091

Dated: 02 December 2005

cc: PCT Operations
Via facsimile: 571-273-3201

FILED IN BPS AT-RT DEPT 10 565 / DEC 2 2005 2 21 PM BPS AT-RT DEPT 10 565 /

* * * COMMUNICATION RESULT REPORT (DEC 2 2005 2 22PM) * * *

FAX HEADER 1 BMS PATENT DEPT
FAX HEADER 2

TRANSMITTED/STORED FILE MODE	DEC 2 2005 2 21PM OPTION	ADDRESS	RESULT	PAGE
3989 MEMORY TX		USPTO	OK	1/1

^ ON 131 148 A 08 W 0 ^ - } 88 Y AC M CO T O

Docket No 10060 PCT

PATENT COOPERATION TREATY

International Application No PCT/US2004/033587
 International Filing Date 12 October 2004
 Priority Date 10 October 2003
 Applicant Bristol Myers Squibb Company et al
 For FULLY HUMAN ANTIBODIES TO HUMAN 4-1BB

International Bureau of WIPO
 34 chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20 Switzerland
 Facsimile (41 22) 740 1435 or
 Facsimile (41-22) 910 06 10

92 BIS CHANGE

SIR

Please amend the records in the above international application to correct the name of the applicant from Bristol-Myers Squibb Company ? to Bristol-Myers Squibb Company. The international application published with a ? after the applicant's name which needs to be removed.

Please note that the 30-month priority date is April 10 2006. Accordingly we would appreciate it if the change was recorded before that date. Please issue form PCT/IB/306 and forward it to us as soon as possible.

Respectfully submitted,

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

By 
 Paul D. Gollan
 Attorney Agent for Applicants
 Reg No 42,591
 P O Box 4000
 Princeton, New Jersey 08543-4000
 Telephone (609) 252-4091

Dated 02 December 2005

cc PCT Operations
 Via facsimile - 571-273 3201

* * * COMMUNICATION RESULT REPORT (DEC 2 2005 2 21PM) * * *

FAX HEADER 1 BMS PATENT DEPT
FAX HEADER 2

TRANSMITTED/STORED FILE MODE	DEC 2 2005 2 20PM OPTION	ADDRESS	RESULT	PAGE
3988 MEMORY TX		41 22 338 89 20	OK	1/1

^ ON 1-33 O A NO W R ^ -33 O Y AG M CO T O

Docket No 10060 PCT

PATENT COOPERATION TREATY

International Application No PCT/US2004/033587
 International Filing Date 12 October 2004
 Priority Date 10 October 2003
 Applicant Bristol-Myers Squibb Company et al
 For FULLY HUMAN ANTIBODIES TO HUMAN 4-1BB

International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20 Switzerland
 Facsimile (41-22) 740 1435 or
 Facsimile (41-22) 910 06 10

92 BIS CHANGE

SIR,

Please amend the records in the above international application to correct the name of the applicant from Bristol Myers Squibb Company ? to Bristol-Myers Squibb Company. The international application published with a ? after the applicant's name, which needs to be removed.

Please note that the 30-month priority date is April 10 2006. Accordingly we would appreciate it if the change was recorded before that date. Please issue form PCT/IB/306 and forward it to us as soon as possible.

Respectfully submitted,

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

By 
 Paul D. Gollan
 Attorney Agent for Applicants
 Reg. No 42 591
 P O Box 4000
 Princeton, New Jersey 08543-4000
 Telephone (609) 252- 4091

Dated 02 December 2005

cc PCT Operations
 Via facsimile - 571 273-3201

204

Docket No 10060- PCT

New Int 1 Application No based on USSN 60/510,193 Filed. 10 October 2003 et al

Documents enclosed Application, General Power of Attorney copy of Certification,
PCT Easy Request, Diskette with Request and Abstract, Figures
and Sequence listing diskette

Express mail mailing label number EV 30 54 8 4 873 US

Date of Deposit 12 October, 2004

I hereby certify that this paper or fee is being deposited with the United States
Postal Service Express Mail Post Office to Addressee service under 37 CFR 1.10
on the date indicated above and is addressed to the Assistant Commissioner for
Patents, Box PCT Washington, D C 20231

Maria Castaldo

(Typed or printed name of person mailing paper or fee)

Maria Castaldo

(Signature of person mailing paper or fee)

206
205

**PCT
INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO**

International Application No
International Filing Date
Applicant's File Reference
Applicant

TO BE ASSIGNED
HEREWITH
10060 PCT
Bristol-Myers Squibb Company

Title FULLY HUMAN ANTIBODIES AGAINST HUMAN 4-1BB

October 11 2004

Mail Stop PCT
Commissioner for Patents
P O Box 1450
Alexandria VA 22313-1450

**STATEMENT TO ACCOMPANY NUCLEOTIDE AND/OR AMINO ACID SEQUENCE
LISTING COMPLYING WITH WIPO STANDARD ST25**

Sir

Applicants hereby provide a Computer Readable Form of the Sequence Listing as well as the Paper Copy thereof. The undersigned states that the Paper Copy and the Computer Readable Form submitted are the same.

Applicants hereby state that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the International application as filed.

Respectfully Submitted



Paul D. Golian
Bristol Myers Squibb Company
Princeton New Jersey USA
(609) 252-4091

206
206

10060 PCT

1/8

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT SAFE [EASY mode] Version 3 50 (Build 0002 162)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	10060 PCT
I	Title of invention	Fully human antibodies against human 4 1BB
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY
II-5	Address:	Route 206 and Province Line Road Princeton New Jersey 08543 4000 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	609 252 4000
II-9	Facsimile No.	609 252 4526
III-1	Applicant and/or inventor	
III 1 1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST First)	JURE KUNKEL Maria
III-1-5	Address:	31 Silvers Lane Plainsboro NJ 08536 United States of America
III-1-6	State of nationality	UY
III-1 7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST First)	HEFTA Laura J
III-2-5	Address.	18 Park Ave Pennington NJ 08534 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is.	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST First)	SANTORO Marc
III-3-5	Address	149 North Main St Yardley PA 19067 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is.	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST First)	GANGULY Subinay
III-4-5	Address.	7 Thornbury Lane Newtown PA 18940 United States of America
III-4-6	State of nationality	IN
III-4-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV 1 1	Name (LAST First)	GOLIAN Paul D
IV 1-2	Address	Bristol Myers Squibb Company P O Box 4000 Princeton New Jersey 08543 4000 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	609 252 4091
IV-1-4	Facsimile No.	609 252 4526
IV 1-5	Agent's registration No.	42 591
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as

207

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-2-1	Name(s)	first named agent BARAJKO Suzanne; BAXAM Deanna(45 266); BELFIELD Jing(45 914); BOGIE Terence(44 544); BUCHHOLZ Briana(39 123); D AMICO Stephen(46 652); DAVIS Stephen(26 693); DUNCAN Laurelee(44 096); DUNCAN Sammy(46 675); GIBBONS Maureen S (44 121); KILCOYNE John(33 100); KLEIN Christopher(34 363); KORSEN Elliott(32 705); LAMERDIN John(44 858); LANGE Keith(44 201); O BRIEN Maureen P Ph D(42 043); PEIST Kenneth(45 006); PROVOOST Jonathan(44 292); RODNEY Burton(22 076); SHER Audrey(39 024); VANATTEN Mary K (39 408); WINSLOW Anastasia(40 875); ALGIERI Aldo(31 697); DUBOFF Samuel(25 969); EPPERSON James(52 867); MAKUJINA Shah(41 174); RYAN Richard(30 491); VOLLES Warren K (33 810); MINGO Pamela A (48 256); GU Henry H (55 227); GREENBLATT Gary D (47 609); PATEL Rena Ph D (41 412); PARLETT Nickki L (44 996); WANG Joseph C (44 391); WILLE Louis J (32 954); CHIN Jennifer T Ph D J D (47 487); KRIEGER Stuart E (28 731)
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1 1	Filing date	10 October 2003 (10 10 2003)
VI-1-2	Number	60/510 193
VI-1 3	Country	US

209

10060 PCT

4/8

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VI-2	Priority claim of earlier national application		
VI-2-1	Filing date	08 October 2004 (08 10 2004)	
VI-2-2	Number		
VI-2-3	Country	US	
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s)	VI 1 VI 2	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor		
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	1	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	1	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)		
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty		

210

10080 PCT

5/8

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-1	Declaration Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(e)(ii)). In a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate Name (LAST First)	in relation to this international application BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i) v)		an assignment from JURE KUNKEL Maria to BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY dated 16 April 2004 (16 04 2004)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from HEFTA Laura J to BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY dated 03 April 2004 (03 04 2004)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from SANTORO Marc to BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY dated 05 April 2004 (05 04 2004)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from GANGULY Subinay to BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY dated 17 April 2004 (17 04 2004)
VIII-2-1(i) x)	This declaration is made for the purposes of	all designations except the designation of the United States of America

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-3-1	Declaration Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4 17(II) and 51bis.1(a)(II)) Name:	in relation to this international application BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No 60/510 193 by virtue of the following
VIII-3-1(i) v)		an assignment from JURE-KUNKEL Maria to BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY dated 16 April 2004 (16 04 2004)
VIII-3-1(i) v)		an assignment from HEFTA Laura J to BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY dated 03 April 2004 (03 04 2004)
VIII-3-1(i) v)		an assignment from SANTORO Marc to BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY dated 05 April 2004 (05 04 2004)
VIII-3-1(i) v)		an assignment from GANGULY Subinay to BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY dated 17 April 2004 (17 04 2004)
VIII-3-1(i) x)	This declaration is made for the purposes of:	all designations

212
212

10080 PCT
PCT REQUEST

7/8
Original (for SUBMISSION)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	8	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	31	
IX-3	Claims	2	
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	29	
IX-7a	Sub-total number of sheets	71	
IX-8a	Sequence listing part of description	24	
IX-7	TOTAL	95	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	
IX-16(A)	Sequence listing in computer readable form:		
IX-16(A)-(B)	additional copies including where applicable the copy for the purposes of international search under Rule 13ter		1 Diskette
IX-17	PCT-SAFE physical media		✓
IX-18	other		
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST First)	GOLIAN, Paul D	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

214
213

10080 PCT

8/8

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11 1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

214

10060 PCT

1/1

PCT (ANNEX FEE CALCULATION SHEET)

Original (for SUBMISSION)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	Date stamp of the receiving Office	
0-4	Form PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet Prepared Using	PCT SAFE [EASY mode] Version 3 50 (Build 0002 162)
0-6	Applicant's or agent's file reference	10060 PCT
2	Applicant	BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier Total amounts (USD)
12-1	Transmittal fee T	⇒ 300
12-2-1	Search fee S	⇒ 1000
12-2-2	International search to be carried out by	EP
12-3	International filing fee (first 30 sheets) H	1134
12-4	Remaining sheets	65
12-5	Additional amount (A)	12
12-6	Total additional amount B	780
12-7	H B	1914
12-12	EASY Filing reduction R	81
12-13	Total international filing fee (I-R) I	⇒ 1833
12-14	Fee for priority document	
	Number of priority documents requested	2
12-15	Fee per document (Q)	20
12-16	Total priority document fee* P	⇒ 40
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+H+P)	⇒ 3173
12-18	Mode of payment	authorization to charge deposit account
12-20	Deposit account instructions	
	The receiving Office	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
12-20-1	Authorization to charge the total fees indicated above	✓
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	✓
12-20-3	Authorization to charge the fee for priority document.	✓
12-21	Deposit account No.	19 3880
12-22	Date	11 October 2004 (11 10 2004)
12-23	Name and signature	GOLIAN Paul D 

Fully human antibodies and antigen binding portions thereof that bind to human 4-1BB and that allow binding of human 4-1BB to a human 4-1BB ligand. In one aspect, the antibody is an IgG4 antibody. Also provided is a method for treating a disease in a subject comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody to said subject. 2/5

216

PCT

Original (for SUBMISSION)

13-2-1	Validation messages Request	Green? The title of the invention should preferably be entered in capital letters Please verify
13-2-4	Validation messages Priority	Yellow! Priority 1: The twelve-month time limit for claiming priority would appear to have expired Please verify
	Validation messages Priority	Yellow Priority 2: Application No is missing
13-2-6	Validation messages Declarations	Green? Manually inputted data Please verify the contents of the information provided
	Validation messages Declarations	Green? Manually inputted data Please verify the contents of the information provided
13-2-7	Validation messages Contents	Yellow! The power of attorney or a copy of the general power of attorney will need to be furnished unless all applicants sign the request form
13-2-8	Validation messages Fees	Green? Please confirm that fee schedule utilized is the latest available
13-2-9	Validation messages Payment	Green? Please ensure that you have a valid deposit account with the receiving Office selected

PCT PETITORIO

Original (para SUBMISSION)

0	Para uso de la Oficina receptora solamente	
0 1	No de Solicitud Internacional	
0-2	Fecha de presentación internacional	
0-3	Nombre de la oficina receptora y Solicitud Internacional de PCT*	
0-4	Forma PCT/RO/101 Petitorio PCT	
0-4-1	Preparado empleando	PCT SAFE [EASY mode] Versión 3 50 (Build 0002 162)
0-5	Petición El Suscrito solicita que la presente Solicitud Internacional sea procesada según el Tratado de Cooperación en Patentes	
0-6	Oficina Receptora (especificada por el Solicitante)	Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos (USPTO) (RO/US)
0-7	Referencia de archivo del solicitante o agente	10060 PCT
I	TÍTULO DE LA INVENCIÓN	Anticuerpos completamente humanos contra el 4 1BB humano
II	SOLICITANTE	
II 1	Esta persona es	solicitante solamente
II-2	Solicitante para	todos los países designados, excepto los US
II-4	Nombre	BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
II-5	Dirección	Route 208 and Province Line Road Princeton New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América
II-6	Nacionalidad	US
II 7	País de Residencia	US
II-8	No Teléfono	609-252-4000
II-9	No de Fax	609-252-4528
III 1	Solicitante y/o Inventor	
III-1 1	Esta persona es	Solicitante e inventor
III-1 2	Solicitante para	Solamente los US
III 1-4	Nombre (APELLIDO Nombre)	JURE-JUNKEL, Maria
III 1-5	Dirección	31 Silvers Lane Plainsboro NJ 08536 Ridgefield CT 06877-0388 Estados Unidos de América
III 1-6	Nacionalidad	UY
III 1 7	País de Residencia	US

219
218

PCT PETITORIO

Original (para SUBMISSION)

III-2	Solicitante y/o Inventor	
III-2-1	Esta persona es	Solicitante e inventor
III-2-2	Solicitante para	Solamente los US
III-2-4	Nombre (APELLIDO Nombre)	HEFTA Laura J
III-2-5	Dirección	18 Park Ave Pennington NJ 08534 Estados Unidos de América
III-2-6	Nacionalidad	US
III-2-7	País de Residencia	US
III-3	Solicitante y/o Inventor	
III-3-1	Esta persona es	Solicitante e inventor
III-3-2	Solicitante para	Solamente los US
III-3-4	Nombre (APELLIDO Nombre)	SANTORO Marc
III-3-5	Dirección	149 North Main St Yardley PA 19087 Estados Unidos de América
III-3-6	Nacionalidad	US
III-3-7	País de Residencia	US
III-4	Solicitante y/o Inventor	
III-4-1	Esta persona es	Solicitante e inventor
III-4-2	Solicitante para	Solamente los US
III-4-4	Nombre (APELLIDO Nombre)	GANGULY Subinay
III-4-5	Dirección	7 Thornbury Lane Newtown PA 18940 Estados Unidos de América
III-4-6	Nacionalidad	IN
III-4-7	País de Residencia	US
IV 1	Agente o Representante común o dirección para correspondencia La persona identificada posteriormente es/ha sido citada para actuar en nombre del (los) solicitante(s) ante las Autoridades Internacionales competentes como	Agente
IV 1-1	Nombre (APELLIDO Nombre)	GOLIAN Paul D
IV 1-2	Dirección	Bristol-Myers Squibb Company P O Box 4000 Princeton New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América
IV 1-3	No Teléfono	609-252-4091
IV 1-4	No de Fax	609-252-4526
IV 1-6	No de registro del agente	42,591

PCT PETITORIO

Original (para SUBMISSION)		
IV 2	Agente(s) adicional(es)	Agente(s) adicional(es) con alguna dirección como el primer agente mencionado
IV 2 1	Nombre(s)	BABAJKO Susanne BAKAM Deanna(45 266) BELFIELD Jing(45 914) BOGIE Terence(44 544) BUCHHOLZ Briana(39 123) D AMICO Stephen(46 652) DAVIS Stephen(26 693) DUNCAN Laurelee(44 096) DUNCAN Sammy(46 675); GIBBONS Maureen S (44 121) KILCOYNE John(33 100) KLEIN Christopher(34 363) KORSEN Elliott(32 705) LAMERDIN John(44 858) LANGE Keith(44 201) O BRIEN Maureen P Ph D(42 043) PEIST Kenneth(45 006) PROVOOST Jonathan(44 292) RODNEY Burton(22 076) SHER Audrey(39 024) VANATTEN Mary K (39 408) WINSLOW Anastasia(40 875) ALGIERI Aldo(31 697) DUBOFF Samuel(25 969) EPPERSON James(52 867) MAKUJINA Shah(41 174) RYAN Richard(30 491) VOLLES Warren K (33 810); MINGO Pamela A (48 256) GU Henry H (55 227) GREENBLATT Gary D (47 609) PATEL Rena Ph D (41 412) PARLETT Nickki L (44 996) WANG Joseph C (44 391) WILLIE Louis J (32 954) CHIN Jennifer T Ph D J D (47 487) KRIEGER Stuart E (28 731)
V	Designación de Estados	
V 1	La publicación de esta petición constituye de acuerdo a la Regla 4 9(a) la designación de todos los Estados Contratantes limitados por la PCT en la fecha de publicación internacional para la concesión de cada tipo de protección disponible y donde sea aplicable por ala concesión tanto de la patente regional como nacional	
VI 1	Reivindicación de prioridad de la solicitud regional previa	
VI 1 1	Fecha de publicación	10 de Octubre de 2003 (10 10 2003)
VI 1 2	Número	60/510 193
VI 1 3	País	US

PCT PETITORIO

Original (para SUBMISSION)

VI 2	Reivindicación de prioridad de la solicitud regional previa	
VI 2 1	Fecha de publicación	8 de Octubre de 2004 (08 10 2004)
VI 2 2	Número	
VI 2 3	País	US
VI 3	Petición del documento de prioridad	
	Se le solicita a la Oficina receptora preparar y enviar a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) previa(s) identificada anteriormente como los punto(s)	VI 1 VI 2
VII	Declaraciones	Número de declaraciones
VII-1	Declaración de la identidad del inventor	
VII-2	Declaración del derecho del solicitante como en la fecha de presentación internacional para solicitar y que se le otorgue una patente	1
VII-3	Declaración del derecho del solicitante como en la fecha de presentación internacional para reclamar la prioridad de la solicitud anterior	1
VII-4	Declaración de calidad de inventor (sólo para los propósitos de la designación de los EUA)	
VII-5	Declaración de descripciones no perjudiciales o excepciones a la falta de novedad	

221

PCT PETITORIO

Original (para SUBMISSION)		
VII-2-1	Declaración Derecho para solicitar y que se le otorgue una patente Declaración del derecho del solicitante como en la fecha de presentación internacional, para solicitar y que se le otorgue una patente (Reglas 4 17(ii) y 51bis.1(a)(ii)) en caso de que la declaración bajo la Regla 4 17(iv) no sea apropiada Nombre (APELLIDO Nombre)	En relación a la solicitud internacional BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY tiene el derecho de aplicar y otorgar una patente en virtud de lo siguiente
VII-2-1(iv)		una cesión de JURE KINKEL Maria para BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY el 16 de Abril de 2004 (16 04 2004)
VII-2-1(iv)		una cesión de HEPTA Laura J para BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY el 3 de Abril de 2004 (03 04 2004)
VII-2-1(iv)		una cesión de SANTORO Marc para BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY el 5 de Abril de 2004 (05 04 2004)
VII-2-1(iv)		Una cesión de GANGULY Subinay para BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY el 17 de Abril de 2004 (17 04 2004)
VII-2-1(b)	Esta declaración es hecha para los propósitos de	Todas las designaciones excepto la designación de los Estados Unidos de América

222

PCT PETITORIO

Original (para SUBMISSION)

VIII-3-1	Declaración Derecho para reclamar la prioridad Declaración del derecho del solicitante como en la fecha de presentación internacional para reclamar la prioridad de la solicitud anterior especificada abajo donde el solicitante no es el solicitante que presentó la solicitud anterior o en donde el nombre del solicitante ha cambiado desde la presentación de la solicitud anterior (Reglas 4 17(III) y 51bis 1(a)(III)) Nombre	En relación a esta solicitud internacional BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY tiene el derecho de reclamar prioridad de la solicitud más temprana No 60/510 193 en virtud de lo siguiente
VIII-3-1(v)		una cesión de JURE KUNKEL Maria para BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY el 16 de Abril de 2004 (16 04 2004)
VIII-3-1(v)		una cesión de HEFTA Laura J para BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY el 3 de Abril de 2004 (03 04 2004)
VIII-3-1(v)		una cesión de SANTORO Marc para BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY el 5 de Abril de 2004 (05 04 2004)
VIII-3-1(v)		Una cesión de GANGULY Subinay para BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY el 17 de Abril de 2004 (17 04 2004)
VIII-3-1(b)	Esta declaración es hecha para los propósitos de:	Todas las designaciones

PCT PETITORIO

Original (para SUBMISSION)

IX	LISTA DE VERIFICACIÓN	Número de hojas	archivo(s) electrónico(s) anexos
IX-1	Petitorio (incluyendo hojas de declaración)	8	✓
IX-2	Descripción (excluyendo la parte del listado de secuencia)	31	
IX-3	Reivindicaciones	2	
IX-4	Resumen	1	✓
IX-5	Dibujos	29	
IX-7a	Número subtotal de hojas	71	
IX-8a	Parte del listado de secuencia de la descripción	24	
IX-7	TOTAL	95	
IX-8	Artículos adicionales hoja de cálculo de tarifas	documento() anexo() en papel ✓	archivo() 1 trónico(s) anexos
IX-16(A)	Listado de secuencia en forma legible en computadora para		
IX-16(A)-(B)	Copias adicionales incluyendo en donde sea aplicable, la copia para propósitos del reporte de búsqueda internacional bajo la Regla 13	-	1 Disquete
IX-17	PCT-EASY disquete		✓
IX 18	Otro:		
IX-19	Figura de los dibujos que debe acompañar al resumen	1	
IX-20	Idioma de presentación de la solicitud internacional	Inglés	
X-1	Firma del solicitante, agente o representante común	(rúbrica)	
X-1 1	Nombre (APELLIDO Nombre)	GOLIAN Paul D	
X-1-2	Nombre del signatario	(rúbrica)	
X 1-3	Cargo		

PCT PETITORIO

Original (para SUBMISSION)
PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA SOLAMENTE

10-1	Fecha del recibo real de la solicitud internacional alegada	
10-2	Dibujos	
10-2-1	Recibidos	
10-2-2	No recibidos	
10-3	Fecha corregida del vencimiento del recibo real a los documentos o dibujos recibidos posteriormente pero a tiempo que complementan la solicitud internacional alegada.	
10-4	Fecha del recibo a tiempo de las correcciones requeridas bajo el artículo 11(2)	
10-5	Autoridad de Búsqueda Internacional especificada por la solicitante	ISA/EP
10-6	Transmisión de copia de búsqueda retardada hasta que la cuota de búsqueda sea pagada	

PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL SOLAMENTE

11 1	Fecha del recibo de la copia de registro por la Oficina Internacional	
------	---	--

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT
NOTIFICACIÓN DEL REGISTRO
DE UN CAMBIO

(PCT Regla 92bis 1 e Instrucciones
Administrativas Sección 422)

Para
GOLIAN Paul D
Bristol-Myers Squibb Company
P O Box 4000
Princeton NJ 08543-4000
Estados Unidos de América

Fecha de envío por correo (día/mes/año)			
12 de Diciembre de 2005 (12 12 2005)			
Referencia de archivo del solicitante o mandatario	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE		
10060 PCT			
Solicitud Internacional No	Fecha de presentación internacional (día/mes/año)		
PCT/US2004/033587	12 de Octubre de 2004 (12 10 2004)		
1 Las siguientes indicaciones aparecen en el registro concerniente			
☐ el solicitante ☐ el inventor ☐ el mandatario ☐ el representante común			
Nombre y dirección		Estado de Nacionalidad	
		Estado de Residencia	
		Teléfono No	
		Facsimile No	
		Tele-impresora No	

2 La Oficina Internacional por la presente le notifica al solicitante que se ha registrado el siguiente cambio referente a			
☐ la persona ☐ el nombre ☐ la dirección ☐ La nacionalidad ☐ la residencia			
Nombre y dirección		Estado de Nacionalidad	
		Estado de Residencia	
		US	
		Teléfono No	
		Facsimile No	
		Tele-impresora No	

3 Observaciones adicionales si son necesarias	
La persona identificada en el Cuadro 2 debe ser agregado al registro como solicitante para los Estados Unidos de América solamente e inventor para todos los Estados designados	

4 Se ha enviado una copia de la presente notificación a	
☒ la Oficina Receptora ☒ Las Oficinas Designadas concernientes	
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☐ Las Oficinas Elegidas concernientes	
☐ la Autoridad del Examen preliminar Internacional ☐ Otros	

Oficina Internacional de la WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20 Suiza Fax No (41-22) 338 87.20	Empleado autorizado Tessadell PAMPLIEGA (Fax 338 87 20) Tel No (41 22) 338 9678
--	---

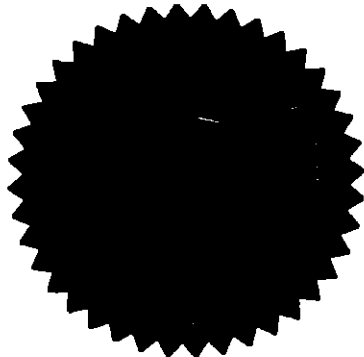
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

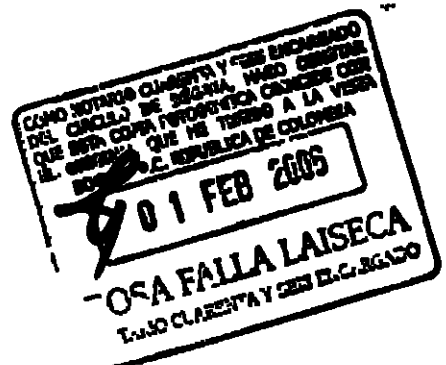
- 1 COUNTRY UNITED STATES OF AMERICA
- 2 THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY
MAURA O KNOBL
- 3 ACTING IN THE CAPACITY OF
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
- 4 BEARS THE SEAL/STAMP OF
MAURA O KNOBL NOTARY

CERTIFIED

- 5 AT TRENTON NEW JERSEY
- 6 THE 13TH DAY OF JANUARY 2006
- 7 BY John E McCormac CPA NEW JERSEY TREASURER
- 8 NO A248886
- 9 SEAL/STAMP
- 10 SIGNATURE



John E McCormac





DE

NO DE FAX

05 ENE 2006 04 19PM P1

227

Brigard & Castro

BOGOTÁ COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO de Bogotá Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial amplio y suficiente, para recibir de las oficinas y autoridades colombianas administrativas judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso la obtención de patentes de invención registros de marcas diseños industriales, modelos de utilidad depósitos de nombres comerciales lemas comerciales y enseñas registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales así como sus prórrogas renovaciones anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio elaborar tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales administrativas y de policía tales como oposiciones al registro de marcas acciones de caducidad cancelación y nulidad acciones reivindicatorias acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias acciones de competencia desleal, demandas penales acciones de indemnización de perjuicios reclamos y observaciones a solicitudes de patentes diseños industriales modelos de utilidad en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares

A este efecto lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes formular descripciones, enmiendas protestas declaraciones oposiciones cancelaciones nulidades apelaciones y reclamos pagar impuestos cuotas y gravámenes prescritos por la ley renunciar o desistír a derechos concedidos o en curso de concesión recibir toda clase de documentos y valores dando al descargo respectivo y en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses) con todas las demás facultades legales necesarias

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistír transigir comprometer y la de sustituir en todo o en parte y revocar sustituciones Asimismo nombro(amos) a JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO domiciliado(s) en la Carrera 7 No 16-58 Piso 9 mis (nuestros) apoderados en Colombia con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo**P WER OF ATTORNEY**

I (We) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciled in Princeton New Jersey USA

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENT and/or CARLOS H PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO of Bogotá Colombia my (our) true and lawful attorneys with special ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative judicial and police offices and authorities in any instance privileges of patents of invention registration of trademarks Industrial designs and utility models registration of commercial names, slogans and emblems registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetable varieties, as well as extensions renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above to prepare prosecute and register licenses of any kind to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse and before any judge corporation public official or authority in judicial administrative and police actions such as oppositions to the registration of trademarks caducity cancellation and nullity actions claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses action of unfair competition criminal proceedings actions for payment of damages claims or observations on patent applications models Industrial designs and utility models in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications formulate descriptions amendments protests declarations oppositions cancellations nullities appeals and claims to pay taxes quotas and assessments prescribed by law renounce or waive the rights granted or in the process of granting to receive all kinds of documents and valuables giving the respective release of receipt and in general to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions At the same time I (We) hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO domiciled in Carrera 7 No 16-58 Piso 9 my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys

Granted and signed in

this 1st day Jan of 2006

Signature

Name
TitleSupra E
Senior Patent

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es

de

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder que el sello estampado por él al pie de tal poder en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

Hoy de de compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que se(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan

Notario Público (sello)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 11 day of January of 2006 personally appeared before me SUZANNE E BABAJKO

to me known and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the SENIOR PATENT COUNSEL

of BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Which is legally constituted for a term not yet expired that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company

State of
under date of

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative

Public Notary (Seal)

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

On this 11th day of January of 2006 personally appeared before me

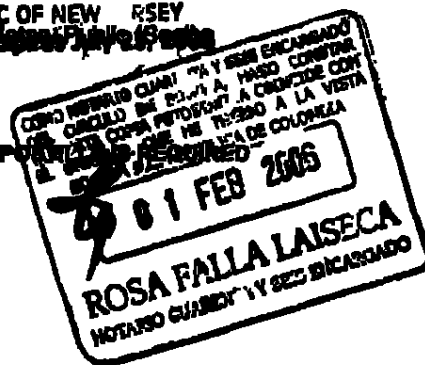
Suzanne E Babajko

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed

Maura O Knobl
Notary Public

MAURA O KNOBL
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires July 2, 2008

LEGALIZATION BY APOSTILLA IS REQUIRED



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY domiciliada en Princeton New
Jersey Estados Unidos de América

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

- 1 PAÍS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
- 2 ESTE DOCUMENTO PUBLICO HA SIDO FIRMADO POR
MAURA O KNOBL
- 3 ACTUANDO EN CAPACIDAD DE
NOTARIO PUBLICO DE NEW JERSEY
- 4 LLEVA EL SELLO/TIMBRE DE
MAURA O KNOBL NOTARIO

CERTIFICADO

- 5 EN TRENTON NEW JERSEY
- 6 EL 13 DE ENERO DE 2006
- 7 POR John E McCormac CPA TESORERO DE NEW JERSEY
- 8 NO A248886
- 9 SELLO/TIMBRE
- 10 FIRMA

(Firma)





Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

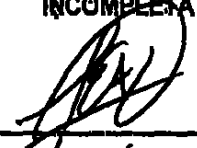
Delegatura de Propiedad Industrial
Division de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Descripción de la invención	()	()
Dibujos de ser estos pertinentes	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica del Esquema Trazado	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable

Fecha


2 de abril de 2006

AS 100 749



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-034941 -00000-0000 Fac 2006-04-10 18:08:40
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTE/II Eya 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folio. 230

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

10-05-2006

SOLICITUD DE.

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY
Dirección P O Box 4000 Route 206 and Province
Line Road Princeton NJ 08543-4000 Estados Unidos
de América
Nacionalidad o Domicilio Estados Unidos
Lugar de Constitución Estados Unidos
Teléfono: Fax
E-mail

IDENTIFICACION

C C ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
Dirección Cra 7 No 16-56 Piso 9
Teléfono 380-2200 Fax 380-2700
E-mail

IDENTIFICACION

C C ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 80 410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre María Jure-Kunkel, Laura J Hefta, Marc Santoro, Subinay Ganguly, Edward L. Hark
Dirección 31 Silvers Lane Plainsboro, NJ 08536 US, 18 Park Avenue Pennington NJ 08534 US,
149 North Main St Yardley PA 19067 US 7 Thornbury Lane, Newtown PA 18940 US, 1004
Edmonds Court, Sunnyvale CA 94087 Estados Unidos de América (Respectivamente)
Nacionalidad o Domicilio Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No PCT/US2004/033587 Fecha 12-10-2004
Publicación Internacional No. WO 2005/035584 A1 Fecha 21-04-2005

Título (54). ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA EL 4-1BB HUMANO (CD137)7 Clasificación Internacional (51) C07K16/28, 16/30, A61K39/397, C07H21/04

A61P35/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐(33) País de
Origen

US

US

(32) Fecha

10-10-2003

08-10-2004

(31) Número de Solicitud

60/510,193

10/861,567

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario ver reverso de esta página

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones

1 Anticuerpo monoclonal o porción de enlace a antígeno del mismo que se enlaza específicamente a 4-1BB que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada caracterizado porque

la región variable de cadena ligera comprende un CDR1 un CDR2 y un CDR3 como se detalla en la figura 4 y

la región variable de cadena pesada comprende un CDR1 un CDR2, y un CDR3 como se detalla en la figura

3

2 Anticuerpo monoclonal o porción de enlace a antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 1 caracterizado porque

la cadena ligera comprende una región variable como se detalla en la figura 4 y

la cadena pesada comprende una región variable como se detalla en la figura 3

3 Anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera y una cadena pesada caracterizado porque la cadena ligera comprende los residuos de aminoácidos 21-236 de SEQ ID

232
233

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY

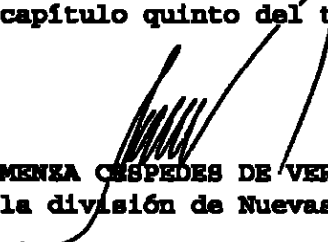
REFERENCIA	Radicación No	06 34941
	Solicitud internacional	US2004033587
	Fecha inicio fase nacional	10/05/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No	8431

Como resultado del examen de forma realizado con fundamento en el artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT) regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio se le comunica que

1 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26 k) Decisión 486

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486 se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2 literal e) del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No 10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 AGO 2006 jramos