SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-085127- -00010-0000

Fecha: 2014-02-27 14:57:46 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 388

Industria y Co
SUPERINTEND

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-041955- -00000-0000

Fecha: 2014-02-27 14:57:46 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 388

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUS

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** ANTICUERPO ANTI-LECTINA SIMILAR A INMUNOGLOBULINA DE UNION A ACIDO SIALICO-15

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** DAIICHI SANKYO COMPANY LIMITED

DOMICILIO TOKYO, JAPON

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-085127- -00010-0000
Fecha: 2014-02-27 14:57:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 388

DIRECCIÓN DE NUEV
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-041955- -00000-0000
Fecha: 2014-02-27 14:57:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ☒ **División** ☐ **Fusión**

☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número_____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Japón	3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-8426, Japón	Tokyo
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

☐ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional
De Páez Luz Clemencia	C.C. 35.456.344	T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general		

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____ De: _____ A: _____	Expediente : **11.085.127** De: _____ A: _____	Expediente_____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No 14-0021750 **Fecha** 2014/02/25
Comprobante de Pago No 14-0021987 **Fecha** 2014/02/26

6. Anexos

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por $464.000.
- [x] Comprobante de pago por 14 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $434.000
- [x] Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- [x] Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- [ ] Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Nombre y apellidos **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**	Firma
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

MCM SGD\SGD\NCA\ID-AF260982\WPC15869

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 11.085.127. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 19587 notificado por fijación en lista del 22 de octubre de 2013. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 08 de julio de 2011 y la prioridad que allí se reivindica el 09 de abril de 2009.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 11.085.127

4

ANTICUERPO ANTI-LECTINA SIMILAR A INMUNOGLOBULINA DE UNIÓN A ÁCIDO SIÁLICO-15

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una sustancia útil como un agente terapéutico y/o preventivo para metabolismo anormal de hueso, y un método de tratamiento y/o prevención del metabolismo anormal de hueso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Se sabe que el hueso es un órgano dinámico que es continuamente remodelado por la formación y resorción repetidas para cambiar su propia morfología y mantener los niveles de calcio en la sangre. El hueso sano mantiene un equilibrio entre la formación de hueso por osteoblastos y resorción de hueso por osteoclastos, y la masa ósea se mantiene constante. Por el contrario, cuando el equilibrio entre la formación de hueso y la resorción de hueso se pierde, ocurre el metabolismo anormal de hueso tal como osteoporosis (WO 07/093042 y Endocrinological Review, (1992) 13, pp. 66-80).

Como factores que regulan el metabolismo de hueso, se han reportado muchas hormonas sistémicas y citocinas locales, y estos factores colaboran unos con otros para formar y mantener el hueso (WO 07/093042 y Endocrinological Review, (1996) 17, pp. 308-332). Como un cambio en tejido óseo debido a envejecimiento, la ocurrencia de osteoporosis es ampliamente usada, pero el mecanismo de su ocurrencia abarca varios factores tales como una disminución en secreción de hormonas sexuales y una anormalidad en los

receptores para las hormonas; variación en expresión de citocina localmente en hueso; expresión de genes de envejecimiento; y falla de diferenciación o disfunción de osteoclastos u osteoblastos, y por lo tanto es difícil considerarlo como un simple fenómeno fisiológico relacionado con la edad. La osteoporosis primaria es dividida en gran medida en osteoporosis postmenopáusica debido a una disminución en secreción de estrógeno y osteoporosis senil debido a envejecimiento, pero el avance de la investigación básica sobre los mecanismos de regulación de la formación de hueso y resorción de hueso es esencial para dilucidar el mecanismo de su ocurrencia y para desarrollar un agente terapéutico para el mismo.

Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de células madre hematopoyéticas, y por la liberación de iones de cloruro e iones de hidrógeno sobre una superficie de hueso a la cual se adhieren los osteoclastos, los osteoclastos acidifican un espacio entre la superficie del hueso y los osteoclastos y también secretan catepsina K que es una proteasa ácida o similares (American Journal of Physiology, (1991) 260, C1315-C1324). Esto causa degradación de fosfato de calcio, activación de proteasas ácidas y degradación de proteínas de la matriz ósea, dando por resultado resorción de hueso.

Se ha encontrado que las células precursoras de osteoclastos se diferencian en osteoclastos por estimulación con RANKL (activador de receptor de ligando NF-κB) expresado en la membrana celular de osteoblastos/células estromáticas presentes en la superficie del hueso (Proceedings de la National Academy of Science de la United States of America, (1998) 95, pp. 3597-3602, y Cell, (1998) 93, pp. 165-176). Se ha revelado que RANKL es una proteína de membrana producida por osteoblastos/células estromáticas, su expresión es regulada por un factor de resorción de hueso, RANKL induce diferenciación de células precursoras de osteoclastos en osteoclastos multinucleados maduros, y

similares (Proceedings de la National Academy of Science de la United States of America, (1998) 95, pp. 3597-3602, y Journal of Bone and Mineral Research, (1998) 23, S222). Además, se ha encontrado que ratones knockout desprovistos de RANKL desarrollan una enfermedad similar a osteopetrosis, y por lo tanto, se ha probado que RANKL es un factor inductor de diferenciación de osteoclastos fisiológico (Nature, (1999) 397, pp. 315-323).

Como preparaciones farmacéuticas para tratar enfermedades del metabolismo de hueso o acortamiento de la duración del tratamiento, se usan bisbifosfonatos, vitamina D_3 activa, calcitonina y derivados de los mismos, hormonas tales como estradiol, SERMs (moduladores de receptor de estrógeno selectivos), ipriflavona, vitamina K_2 (menatetrenona), PTH, preparaciones de calcio, y similares. Sin embargo, estos agentes medicinales no siempre son satisfactorios en términos de resultado trerapéutico y se ha requerido el desarrollo de un agente medicinal con un efecto terapéutico más potente.

Las membranas celulares de células inmunes son cubiertas con un revestimiento denso de varios glicanos tales como glicanos sialilatados que son reconocidos por varias proteínas de unión a glicano. Las lectinas similares a inmunoglobulina de unión a ácido siálico (de aquí en adelante referidas como "siglecs") son una familia de proteínas de membrana de tipo I que reconocen glicanos sialilatados y se unen a los mismos. Muchas siglecs son expresadas en las membranas celulares de células inmunes y reconocen ácido siálico de manera similar presentes en las membranas celulares de células inmunes y regulan interacción celular o función celular y se considera que están implicadas en respuestas inmunológicas (Nature Reviews Immunology, (2007) 7, pp. 255-266). Sin embargo, también existen muchas moléculas de siglec cuyas funciones fisiológicas no han sido dilucidadas aún. Siglec-15 (lectina similar a inmunoglobulina de unión a ácido siálico-15) es una molécula que se ha reportado

recientemente que pertenece a las Siglecs (véase, por ejemplo, documento que no es patente 10) y es idéntica a una molécula llamada CD33L3 (similar a molécula CD33 3). Esta molécula es altamente conservada evolutivamente de pez a humanos y se ha encontrado que es fuertemente expresada en células dendríticas y/o macrófagos de bazo humano y nodos linfáticos. Además, como resultado de una prueba de unión usando una sonda de ácido siálico, también se ha encontrado que Siglec-15 humana se une a Neu5Acα2-6GalNAc y que Siglec-15 de ratón se une además a Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc, y similares (véase, por ejemplo, Glycobiology, (2007) 17, pp. 838-846). Hasta recientemente, el papel fisiológico de Siglec-15 no había sido revelado, sin embargo, se ha reportado que la expresión de Siglec-15 incrementa con la diferenciación y maduración de osteoclastos, y la diferenciación de osteoclastos es inhibida al disminuir la expresión de Siglec-15 por interferencia de ARN (véase, por ejemplo, WO 07/093042). Además, el efecto de un anticuerpo anti-Siglec-15 sobre la diferenciación de osteoclastos ha sido revelada por primera vez en el documento WO 09/48072 (publicado el 16 de abril de 2009), sin embargo, una secuencia de anticuerpo que se puede administrar a humanos aún no ha sido dilucidada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Problemas que ha de resolver la invención

Un objeto de la invención es proveer un gen que es específicamente expresado en varias formas de metabolismo anormal de hueso que se ven en osteoporosis, artritis reumatoide, metástasis de cáncer a hueso o similar, una sustancia que inhibe la diferenciación y maduración de osteoclastos y la actividad de los mismos, y un agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo anormal de hueso.

Medios para resolver los problemas

Los inventores de la presente estudiaron para dilucidar el mecanismo de diferenciación, maduración y activación de osteoclastos a fin de encontrar una sustancia que tiene un efecto terapéutico y/o preventivo sobre el metabolismo anormal de hueso. Como resultado, los inventores de la presente encontraron que la expresión de gen de Siglec-15 incrementa con la diferenciación y maduración de osteoclastos, y también encontraron que la diferenciación de osteoclastos es inhibida por un anticuerpo que específicamente se une a Siglec-15. Además, los inventores de la presente humanizaron un anticuerpo anti-ratón Siglec-15 de rata obtenido, y por lo tanto completaron la invención.

Es decir, la invención incluye las siguientes invenciones.

(1) Un anticuerpo que se une a un polipétido que comprende residuos de aminoácidos 39 a 165 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 e inhibe la formación de osteoclastos y/o resorción osteoclástica de hueso, o un fragmento funcional del anticuerpo.

(2) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (1), caracterizado porque:

una secuencia de cadena pesada contiene una región variable que tiene CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y el CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 44, el CDRH2 comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 97, y el CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46; y

una secuencia de cadena ligera contiene una región variable que tiene CDRL1, CDRL2, y CDRL3, y el CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 47, el CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48, y el CDRL3

comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 49.

(3) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (2), caracterizado porque contiene una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 41 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 132 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 43.

(4) El fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de (1) a (3) que se selecciona del grupo que consiste de Fab, F(ab')2, Fab' y Fv.

(5) El anticuerpo de conformidad con cualquiera de (1) a (3), caracterizado porque es scFv.

(6) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de (1) a (4), caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

(7) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (6), caracterizado porque comprende una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 41 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 237 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 43.

(8) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de (1) a (4), y (6), caracterizado porque el anticuerpo es humanizado.

(9) El anticuerpo de conformidad con (7) o (8), en donde la cadena pesada tiene una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina G2 humana y la cadena ligera tiene una región constante de una cadena ligera de

inmunoglobulina κ humana.

(10) Un anticuerpo que inhibe la formación de osteoclastos y/o resorción osteoclástica de hueso o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo contiene:

(a) una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de las siguientes secuencias de aminoácidos:

a1) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 51;

a2) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 53;

a3) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 55;

a4) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 57;

a5) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 59;

a6) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99;

a7) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101;

a8) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de por lo menos 95% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de a1) a a7);

a9) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de por lo menos 99% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de a1) a a7); y

a10) una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, deleción o adición de uno a varios residuos de aminoácidos en cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de a1) a a7); y

(b) una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de las siguientes secuencias de aminoácidos:

b1) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 61;

b2) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 63;

b3) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 65;

b4) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 132 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 67;

b5) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 69;

b6) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de

aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 71;

b7) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 103;

b8) una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 105;

b9) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de por lo menos 95% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de b1) a b8);

b10) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de por lo menos 99% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de b1) a b8); y

b11) una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, deleción o adición de uno a varios residuos de aminoácidos en cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de b1) a b8).

(11) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 51 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 61.

(12) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de

conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 53 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 63.

(13) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 55 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 65.

(14) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 55 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 132 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 67.

(15) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de

conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 57 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 69.

(16) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 59 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 71.

(17) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 69.

(18) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de

conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 69.

(19) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 103.

(20) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99 y una secuencia de cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 105.

(21) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de

conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 51 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 61.

(22) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 53 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 63.

(23) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 55 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 65.

(24) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 55 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 237 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 67.

(25) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 57 y una secuencia de cadena ligera

que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 69.

(26) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 59 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 71.

(27) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 466 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 69.

(28) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 466 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 69.

(29) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 466 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 103.

(30) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de

conformidad con (10), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos 20 a 466 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99 y una secuencia de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 105.

(31) Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende por lo menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de conformidad con (1) a (30).

(32) La composición farmacéutica de conformidad con (31), caracterizada por ser un agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo anormal de hueso.

(33) Una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir el metabolismo anormal de hueso, caracterizado porque comprende por lo menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de conformidad con (1) a (30) y por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de bisbifosfonatos, vitamina D_3 activa, calcitonina y derivados de los mismos, hormonas tales como estradiol, SERMs (moduladores de receptor de estrógeno selectivos), ipriflavona, vitamina K_2 (menatetrenona), preparaciones de calcio, PTH (hormona paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos, receptores de TNF solubles, anticuerpos anti-TNF-α o fragmentos funcionales de los anticuerpos, anti-PTHrP (proteína relacionada con hormona paratiroidea) anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos, antagonistas de receptor de IL-1, anticuerpos anti-receptor de IL-1 o fragmentos funcionales de los anticuerpos, anticuerpos anti-RANKL o fragmentos funcionales de los anticuerpos, y OCIF (factor inhibidor de osteoclastogénesis).

(34) La composición farmacéutica de conformidad con (32) o (33), en donde el metabolismo anormal de hueso se selecciona del grupo que consiste de

osteoporosis, artritis reumatoide acompañante de destrucción de hueso, hipercalcemia cancerosa, mieloma múltiple o metástasis de cáncer a hueso acompañante de destrucción de hueso, tumor de células gigantes, osteopenia, pérdida de dientes debido a periodontitis, osteólisis alrededor de una articulación prostética, destrucción de hueso en osteomielitis crónica, enfermedad de los huesos de Paget, osteodistrofia renal, y osteogénesis imperfecta.

(35) La composición farmacéutica de conformidad con (34), caracterizada porque el metabolismo anormal de hueso es osteoporosis, artritis reumatoide acompañante de destrucción de hueso, o metástasis de cáncer a hueso acompañante de destrucción de hueso.

(36) La composición farmacéutica de conformidad con (35), caracterizado porque el metabolismo anormal de hueso es osteoporosis.

(37) La composición farmacéutica de conformidad con (36), caracterizado porque la osteoporosis es osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis senil, osteoporosis secundaria debido al uso de un agente terapéutico tal como un esteroide o un inmunosupresor, o artritis reumatoide acompañante de osteoporosis.

(38) Un método de tratamiento y/o prevención metabolismo anormal de hueso, caracterizado por la administración de por lo menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de conformidad con (1) a (30).

(39) Un método de tratamiento y/o prevención metabolismo anormal de hueso, caracterizado por la administración simultánea o sucesiva de por lo menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de conformidad con (1) a (30) y por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de bisbifosfonatos, vitamina D_3 activa, calcitonina y derivados de los mismos, hormonas tales como estradiol, SERMs (moduladores de receptor de

estrógeno selectivos), ipriflavona, vitamina K_2 (menatetrenona), preparaciones de calcio, PTH (hormona paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos, receptores de TNF solubles, anti-TNF-α anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos, anti-PTHrP (proteína relacionada con hormona paratiroidea) anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos, antagonistas de receptor de IL-1, anticuerpos anti-receptor de IL-1 o fragmentos funcionales de los anticuerpos, anticuerpos anti-RANKL o fragmentos funcionales de los anticuerpos, y OCIF (factor inhibidor de osteoclastogénesis).

(40) El método de tratamiento y/o prevención de conformidad con (38) o (39), caracterizado porque el metabolismo anormal de hueso es osteoporosis, artritis reumatoide acompañante de destrucción de hueso, o metástasis de cáncer a hueso acompañante de destrucción de hueso.

(41) El método de tratamiento y/o prevención de conformidad con (40), caracterizado porque el metabolismo anormal de hueso es osteoporosis.

(42) El método de tratamiento y/o prevención de conformidad con (41), caracterizado porque la osteoporosis es osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis senil, osteoporosis secundaria debido al uso de un agente terapéutico tal como un esteroide o un inmunosupresor, o artritis reumatoide acompañante de osteoporosis.

(43) Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de conformidad con cualquiera de (3), (7), y (10) a (30).

(44) El polinucleótido de conformidad con (43), caracterizado porque contiene una secuencia de nucleótido que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 40 y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 396 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 42.

(45) El polinucleótido de conformidad con (44), caracterizado porque

contiene una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 40 y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 711 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 42.

(46) El polinucleótido de conformidad con (43), caracterizado porque contiene:

(a) un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de las siguientes secuencias de nucleótidos:

a1) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 50;

a2) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 52;

a3) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54;

a4) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 56;

a5) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 58;

a6) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98;

a7) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 100;

a8) una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementarios a cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de a1) a a7) bajo condiciones astringentes; y

a9) una secuencia de nucleótidos que incluye una sustitución,

deleción o adición de uno a varios nucleótidos en cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de a1) a a7); y

(b) un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de las siguientes secuencias de nucleótidos:

b1) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 60;

b2) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 62;

b3) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 64;

b4) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 396 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 66;

b5) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68;

b6) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 70;

b7) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 102;

b8) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 104;

b9) una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementarios a cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de b1) a b8) bajo condiciones astringentes; y

b10) una secuencia de nucleótidos que incluye una sustitución, deleción o adición de uno a varios nucleótidos en cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de b1) a b8).

(47) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 50, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 60.

(48) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 52, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 62.

(49) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 64.

(50) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 396 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 66.

(51) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos

representada por SEQ ID NO: 56, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

(52) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 58, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 70.

(53) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

(54) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 100, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

(55) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 102.

(56) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 104.

(57) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 50, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 60.

(58) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 52, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 62.

(59) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 64.

(60) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos

representada por SEQ ID NO: 54, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 711 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 66.

(61) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 56, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

(62) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 58, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 70.

(63) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

(64) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 100, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

(65) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 102.

(66) El polinucleótido de conformidad con (46), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 104.

(67) Un vector, que comprende cualquiera de los polinucleótidos de conformidad con (43) a (66).

(68) Una célula hospedera transformada, que comprende cualquiera de los polinucleótidos de conformidad con (43) a (66).

(69) Una célula hospedera transformada, que comprende el vector de conformidad con (67).

(70) Un método para producir el anticuerpo de conformidad con cualquiera de (3), (7), y (10) a (30), que comprende cultivar la célula hospedera de conformidad con (68) o (69), y purificar un anticuerpo del producto de cultivo resultante.

Ventaja de la invención

De conformidad con la invención, se puede obtener un agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo anormal de hueso cuyo mecanismo de acción es inhibir la diferenciación y maduración de osteoclastos y la actividad

de resorción de hueso de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados de la evaluación de la pureza de Siglec-15-His de ratón purificada por cromatografía en columna HisTrap HP y cromatografía en columna Resource Q a través de electroforesis de SDS-poliacrilamida y tinción con plata.

La figura 2 muestra los resultados de la detección de las características de Siglec-15-His de ratón purificada por cromatografía en columna HisTrap HP y cromatografía en columna Resource Q a través de electroforesis de SDS-poliacrilamida y Western blotting usando un anticuerpo anti-V5-HRP.

La figura 3 muestra los resultados de la evaluación de la pureza de Siglec-15-Fc de ratón purificada por proteína en columna HiTrap Protein A a través de electroforesis de SDS-poliacrilamida y tinción con plata.

La figura 4 muestra los resultados de la prueba de la unión de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata a una placa que tenía Siglec-15-Fc de ratón inmovilizado en el mismo por un método de ELISA. El símbolo (◆) denota anticuerpo #1A1, el símbolo (■) denota anticuerpo #3A1, el símbolo (▲) denota anticuerpo #8A1, el símbolo (×) denota anticuerpo #24A1, el símbolo (●) denota anticuerpo #32A1, el símbolo (○) denota anticuerpo #34A1, el símbolo (+) denota anticuerpo #39A1, el símbolo (-) denota anticuerpo #40A1, el símbolo (—) denota anticuerpo #41A1, el símbolo (◇) denota anticuerpo #61A1, and el símbolo (□) denota control IgG.

La figura 5 muestra los resultados de la prueba del efecto de la adición de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (#3A1, #8A1, o #32A1) sobre la diferenciación de osteoclastos (estimulación con RANKL) de

células no adherentes de médula ósea de ratón. Incidentalmente, la IgG de control de rata en el dibujo es un control negativo común a las figuras 5 y 6.

La figura 6 muestra los resultados de la prueba del efecto de la adición de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (#34A1, #39A1 o #40A1) sobre diferenciación de osteoclastos (estimulación con RANKL) de células no adherentes de médula ósea de ratón. Incidentalmente, el anticuerpo policlonal anti-ratón Siglec-15 de conejo No. 3 en el dibujo es un control positivo común a las figuras 5 y 6.

La figura 7 muestra los resultados de la evaluación de la pureza de Siglec-15-His humana purificada por cromatografía en columna HisTrap HP y cromatografía en columna Resource Q a través de electroforesis de SDS-poliacrilamida y tinción con plata.

La figura 8 muestra los resultados de la evaluación de la pureza de Siglec-15-Fc humana purificada por cromatografía en columna Protein A a través de electroforesis de SDS-poliacrilamida.

La figura 9 muestra los resultados de la prueba de la unión a un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata a una placa que tenía Siglec-15-Fc humana inmovilizada sobre la misma por un método de ELISA. El símbolo (◆) denota anticuerpo #1A1, el símbolo (■) denota anticuerpo #3A1, el símbolo (▲) denota anticuerpo #8A1, el símbolo (×) denota anticuerpo #24A1, el símbolo (●) denota anticuerpo #32A1, el símbolo (○) denota anticuerpo #34A1, el símbolo (+) denota anticuerpo #39A1, el símbolo (-) denota anticuerpo #40A1, el símbolo (—) denota anticuerpo #41A1, el símbolo (◇) denota anticuerpo #61A1, y el símbolo (□) denota control IgG.

La figura 10 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción con TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos gigantes a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales mediante la adición de un

anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata.

La figura 11 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos gigantes a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales mediante la adición de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1).

La figura 12 es una gráfica que muestra la inhibición de la actividad de resorción de hueso osteoclastos humanos normales mediante la adición de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) (N=6).

La figura 13A es una gráfica que muestra el efecto de incrementar la densidad de minerales de hueso de la espina lumbar cuando un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata se administró a ratas ovariectomizadas durante 4 semanas; y la figura 13B es una gráfica que muestra el efecto de disminuir excreción urinaria de desoxipiridinolina cuando un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata se administró a ratas ovariectomizadas durante 4 semanas.

La figura 14 es una gráfica que muestra que un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 se une al dominio V-set de Siglec-15 humana por ELISA competitiva.

La figura 15 es una gráfica que muestra que un anticuerpo #32A1 de rata y un anticuerpo quimérico humano del mismo tiene sustancialmente la misma afinidad para Siglec-15-Fc de ratón por ELISA competitiva.

La figura 16 muestra gráficas que ilustran, por la actividad enzimática de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos de ratón mediante la adición de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) y un anticuerpo quimérico del mismo (N=3).

La figura 17 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos gigantes a partir de células

precursoras de osteoclastos humanos normales mediante la adición de un anticuerpo quimérico humano de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1.

La figura 18 es una vista en la cual se ha confirmado que 6 tipos de anticuerpos anti-ratón Siglet-15 de rata se unen a proteína Siglec-15 de ratón de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo por un método de ELISA usando una placa que tenía Siglec-15-Fc de ratón inmovilizada en la misma.

La figura 19 es una vista en la cual se ha confirmado que 6 tipos de anticuerpos anti-ratón Siglet-15 de rata se unen a proteína Siglec-15 humana de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo por un método de ELISA usando una placa que tiene Siglec-15-Fc humana inmovilizada en la misma.

La figura 20 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos de ratón gigantes bajo estimulación con TNFα mediante la adición de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) o un anticuerpo quimérico del mismo.

La figura 21 muestra gráficas que ilustran, mediante la actividad enzimática de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos de ratón bajo estimulación con TNFα mediante la adición de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) o un anticuerpo quimérico del mismo (N=3).

La figura 22 muestra gráficas que ilustran, mediante la actividad enzimática de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos de rata mediante la adición de un anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (#8A1 o anticuerpo #32A1) (N=3).

La figura 23 muestra una secuencia de nucleótidos clonada de una cadena pesada de #32A1 de rata y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 24 muestra una secuencia de nucleótidos clonada una cadena ligera #32A1 de rata y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 25 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de anticuerpo quimérico humano #32A1 y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 26 muestra una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de anticuerpo quimérico humano #32A1 y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 27 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T1H y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 28 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T2H y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 29 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T3H y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 30 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T5H y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 31 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T6H y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 32 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T1L y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 33 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T2L y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 34 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T3L y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 35 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T4L y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 36 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T5L y

una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 37 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-T6L y una secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 38 muestra secuencias de aminoácidos de h#32A1-T7H, h#32A1-T8H, y h#32A1-T9H.

La figura 39 muestra secuencias de aminoácidos de h#32A1-T10H, h#32A1-T11H, y h#32A1-T12H.

La figura 40 muestra secuencias de aminoácidos de h#32A1-T7L, h#32A1-T8L, h#32A1-T9L, h#32A1-T10L, y h#32A1-T11L.

La figura 41 muestra secuencias de aminoácidos de h#32A1-T12L, h#32A1-T13L, h#32A1-T14L, h#32A1-T15L, y h#32A1-T16L.

La figura 42 muestra secuencias de aminoácidos de h#32A1-T17L, h#32A1-T18L, h#32A1-T19L, h#32A1-T20L, y h#32A1-T21L.

La figura 43 muestra secuencias de aminoácidos de h#32A1-T22L, h#32A1-T23L, h#32A1-T24L, y h#32A1-T25L.

La figura 44 muestra gráficas que ilustran, por la actividad enzimática de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos de ratón mediante la adición de un anticuerpo anti-ratón Siglec-15 de rata humanizado (h#32A1-T1, h#32A1-T2, o h#32A1-T3). Incidentalmente, el anticuerpo #32A1 de rata en el dibujo es un control positivo común a las figuras 44 y 45.

La figura 45 muestra gráficas que ilustran, por la actividad enzimática de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos de ratón mediante la adición de un anticuerpo anti-ratón Siglec-15 de rata humanizado (h#32A1-T4, h#32A1-T5, o h#32A1-T6).

La figura 46 muestra gráficas que ilustran, por la actividad enzimática de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos de ratón mediante la adición de un anticuerpo anti-ratón Siglec-15 de rata humanizado (h#32A1-H1-1/L5 o

h#32A1-H5/L5). Incidentalmente, el anticuerpo #32A1 de rata y anticuerpo qumérico humano #32A1 en el dibujo son controles positivos comunes a las figuras 46 y 47.

La figura 47 muestra gráficas que ilustran, por la actividad enzimática de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos de ratón mediante la adición de un anticuerpo anti-ratón Siglec-15 de rata humanizado (h#32A1-H1-1/L2-16 o h#32A1-H-1/L2-15).

La figura 48 muestra gráficas que ilustran la inhibición de la actividad de resorción de hueso osteoclastos humanos normales mediante la adición de un anticuerpo anti-ratón Siglec-15 de rata humanizado (h#32A1-T1, h#32A1-T2, h#32A1-T3, h#32A1-T4, h#32A1-T5, o h#32A1-T6). Incidentalmente, el anticuerpo #32A1 de rata y el anticuerpo qumérico humano #32A1 en el dibujo son controles positivos comunes a las figuras 48 y 49.

La figura 49 muestra gráficas que ilustran la inhibición de la actividad de resorción de hueso osteoclastos humanos normales mediante la adición de un anticuerpo anti-ratón Siglec-15 de rata humanizado (h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L2-16, o h#32A1-H1-1/L2-5).

La figura 50 es un termograma obtenido para determinar la estabilidad térmica del anticuerpo h#32A1-H5/L5.

La figura 51 es un termograma obtenido para determinar la estabilidad térmica del anticuerpo h#32A1-H1-1/L5.

La figura 52 es un termograma obtenido para determinar la estabilidad térmica del anticuerpo h#32A1-H1-1/L2-5.

La figura 53 es un termograma obtenido para determinar la estabilidad térmica del anticuerpo h#32A1-H1-1/L2-16.

La figura 54 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-H1-1 y la secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 55 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-H5 y la secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 56 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-L2-15 y la secuencia de aminoácidos de la misma.

La figura 57 muestra una secuencia de nucleótidos de h#32A1-L2-16 y la secuencia de aminoácidos de la misma.

Modo para llevar a cabo la invención

El término "gen", como se usa aquí, incluye no sólo ADN, sino también ARNm, ADNc y ARNc.

El término "polinucleótido", como se usa aquí, se usa con el mismo significado que un "ácido nucleico" y también incluye ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos y iniciadores.

Los términos "polipéptido" y "proteína", como se usa aquí, se usan sin distinción.

El término "fracción de ARN", como se usa aquí, se refiere a una fracción que contiene ARN.

El término "célula", como se usa aquí, también incluye células en un animal individual y células cultivadas.

El término "Siglec-15", como se usa aquí, se usa con el mismo significado que "proteína Siglec-15".

El término "formación de osteoclastos", como se usa aquí, se usa con el mismo significado que "diferenciación de osteoclastos" o "maduración de osteoclastos".

El término "fragmento funcional de un anticuerpo", como se usa aquí, se refiere a un fragmento parcial de un anticuerpo que tiene una actividad de unión a antígeno e incluye Fab, F(ab')2, Fv, scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales,

anticuerpos poliespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo, y similares. El término también abarca Fab' que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenido mediante tratamiento de F(ab')2 bajo condiciones reductoras. Sin embargo, el término no se limita a estas moléculas siempre que el fragmento tenga una afinidad de unión para un antígeno. Además, estos fragmentos funcionales incluyen no sólo un fragmento obtenido por tratamiento de una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima apropiada, pero también una proteína producida en una célula hospedera apropiada usando un gen de anticuerpo genéticamente modificado.

El término "epítope", como se usa aquí, se refiere a un péptido parcial o una estructura terciaria parcial de Siglec-15 a la cual se une un anticuerpo anti-Siglec-15 específico. El epítope antes mencionado que es un péptido parcial de Siglec-15 se puede determinar por un método bien conocido por los expertos en la técnica tales como un inmunoensayo. Sin embargo, por ejemplo, se puede utilizar el siguiente método. Se producen varias estructuras parciales de Siglec-15. En la producción de las estructuras parciales, se puede usar una técnica de síntesis de oligopéptidos conocida. Por ejemplo, una serie de polipéptidos que han reducido apropiadamente longitudes obtenidas por acortamiento secuencial de Siglec-15 del C-terminal o N-terminal son producidas usando una técnica de recombinación genética conocida por los expertos en la técnica. Por lo tanto, la reactividad de un anticuerpo contra estos polipéptidos es examinada y un sitio de reconocimiento es determinado aproximadamente. Después, péptidos que tienen longitudes más cortas son sintetizados y la reactividad con estos péptidos es examinada, por lo que se puede determinar el epítope. Además, el epítope que es una estructura terciaria parcial de Siglec-15 que se une a un anticuerpo para Siglec-15 específico se puede determinar al

especificar los residuos de aminoácidos de Siglec-15 adyacentes al anticuerpo por un análisis de ratyos X. Si un segundo anticuerpo anti-Siglec-15 se une a un péptido parcial o una estructura terciaria parcial a la cual se une un primer anticuerpo anti-Siglec-15, se puede determinar que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo comparten el mismo epítope. Además, al confirmar que el segundo anticuerpo anti-Siglec-15 compite con el primer anticuerpo anti-Siglec-15 por la unión a Siglec-15 (es decir, el segundo anticuerpo inhibe la unión entre Siglec-15 y el primer anticuerpo), se puede determinar que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo comparten el mismo epítope aun cuando la secuencia o estructura de un epítope específico no ha sido determinada. Además, cuando el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítope y también el primer anticuerpo tiene un efecto especial tal como una actividad neutralizante de antígeno, el segundo anticuerpo se puede esperar que tenga la misma actividad.

Se sabe que cada cadena pesada y ligera de una molécula de anticuerpo tiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs). La región determinante de complementariedad también se denomina el dominio hipervariable, y está presente en una región variable de cada cadena pesada y ligera de un anticuerpo. Es un sitio que tiene variabilidad inusualmente alta en su estructura primaria, y hay tres CDRs separadas en la estructura primaria de cada cadena de polipéptido pesada y ligera. En esta descripción, en cuanto a las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo, las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada están representadas por CDRH1, CDRH2 y CDRH3 del lado amino-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, y las regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera están representadas por CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del lado amino-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios son próximos unos a otros en la estructura terciaria y

determinan la especificidad para un antígeno al cual se une el anticuerpo.

La frase "hibridación se realiza bajo condiciones astringentes", como se usa aquí, se refiere a hibridación que se realiza bajo condiciones bajo las cuales la identificación se puede lograr al realizar hibridación a 68°C en una solución de hibridación comercialmente disponible, ExpressHyb Hibridization Solution (fabricada por Clontech, Inc.) o al realizar hibridación a 68°C en presencia de 0.7 a 1.0 M de NaCl usando un filtro que tiene ADN inmovilizado en la misma, seguido por realizar el lavado a 68°C usando 0.1 a 2 x SSC de solución (1 x SSC de solución está compuesta de 150 mM de NaCl y 15 mM de citrato de sodio) o bajo condiciones equivalentes a la misma.

1. Siglec-15

Los inventores de la presente han encontrado que el gen de Siglec-15 es específicamente expresado en tumores de células gigantes y también han encontrado que el nivel de expresión del gen de Siglec-15 incrementa cuando una línea de células derivadas de monocitos se diferencia en osteoclastos.

En cuanto a Siglec-15 que ha de ser usado en la invención, Siglec-15 es directamente purificado a partir de monocitos o células de médula ósea de un humano, mamífero no humano (tal como cobayo, rata, ratón, conejo, cerdo, oveja, ganado vacuno o mono) o pollo y se usa, o una fracción de membrana celular de las células antes mencionadas se prepara y se puede usar. Además, Siglec-15 se puede obtener por síntesis *in vitro* de la misma o producción de la misma en una célula hospedera a través de ingeniería genética. En la producción por ingeniería genética, específicamente, el ADNc de Siglec-15 es integrado en un vector capaz de expresar ADNc de Siglec-15, y Siglec-15 es sintetizada en una solución que contiene una enzima, un sustrato, y una sustancia de energía requerida para transcripción y traducción, u otra célula hospedera procariótica o eucariótica es

transformada para expresar Siglec-15, por lo que se puede obtener la proteína.

La secuencia de nucleótidos de ADNc de Siglec-15 humana ha sido registrada en GenBank con un número de acceso de NM_213602 y está representada por SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias, y su secuencia de aminoácidos está representada por SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias. La secuencia de nucleótidos de ADNc de Siglec-15 de ratón ha sido registrada en GenBank con un número de acceso de XM_884636 y está representada por SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias, y su secuencia de aminoácidos está representada por SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias. La Siglec-15 humana madura de la cual ha sido removida la secuencia de señal corresponde a una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 328 de la secuencia de aminoácidos representada by SEQ ID NO: 2. Además, Siglec-15 de ratón de la cual ha sido removida la secuencia de señal corresponde a una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 341 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4. Incidentalmente, Siglec-15 algunas veces se denomina 3 similar a antígeno CD33, 3 similar a molécula de CD33, 3 simlar a CD33, o CD33L3, y todos estos representan la misma molécula.

El ADNc de Siglec-15 se puede obtener, por ejemplo, por un denominado método de PCR en el cual una reacción en cadena de polimerasa (de aquí en adelante referida como "PCR") se realiza usando una genoteca de ADNc que expresa ADNc de Siglec-15 como una plantilla y iniciadores que específicamente amplifica ADNc de Siglec-15 (Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, 487-49).

Además, un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementarios a por lo menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias de nucleótidos

representadas por SEQ ID NOS: 1 y 3 en el listado de secuencias bajo condiciones astringentes y codifica una proteína que tiene una actividad biológica comparable con la de Siglec-15 es también considerada como ADNc de Siglec-15. Además, un polinucleótido que es una variante de empalme transcrita del locus de Siglec-15 de humano o ratón o un polinucleótido que hibrida a una secuencia complementaria al mismo bajo condiciones astringentes y codifica una proteína que tiene una actividad biológica comparable con la de Siglec-15 es también considerada como ADNc de Siglec-15.

Además, una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye substitución, deleción o adición de uno o varios aminoácidos en por lo menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 2 y 4 en el listado de secuencias o una secuencia de aminoácidos obtenida al remover la secuencia de señal de cualquiera de estas secuencias y tiene una actividad biológica comparable con la de Siglec-15 es también considerada como Siglec-15. Además, una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de empalme transcrita del locus de Siglec-15 de humano o ratón o una secuencia de aminoácidos que incluye una substitución, deleción o adición de uno o varios aminoácidos en la misma y tiene una actividad biológica comparable con la de Siglec-15 es también considerada como Siglec-15.

2. Detección del metabolismo anormal de hueso

Un análisis del nivel de expresión del gen de Siglec-15 en un grupo de muestras de prueba de varios tejidos óseos humanos mostró que el nivel de expresión del gene significativamente incrementa en tumor de células gigantes (GCT) que es un tumor de hueso con un gran número de células gigantes multinucleadas similares a osteoclastos que se producen y se caracteriza por

hallazgos clínicos de destrucción osteolítica de hueso (Bullough et al., Atlas of Orthopedic Pathology 2ª. edición, pp. 17.6-17.8, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1992)).

También se encontró que el nivel de expresión del gen de Siglec-15 incrementa cuando una línea de células derivadas de monocitos es diferenciada en osteoclastos.

Por consiguiente, se considera que Siglec-15 está asociada con patologías humanas tales como GCT en las cuales la resorción de hueso es incrementada. En otras palabras, la medición del nivel de expresión del gen de Siglec-15 y/o Siglec-15 en cada célula y/o cada tejido permite la determinación del estado de metabolismo anormal de hueso acompañado por la sobreexpresión de Siglec-15. El metabolismo anormal de hueso como se usa aquí se refiere a un trastorno caracterizado por pérdida neta de hueso, y ejemplos específicos del mismo incluyen, pero no se limitan a, osteoporosis (osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis senil, osteoporosis secundaria debido al uso de un agente terapéutico tales como un esteroide o un inmunosupresor, o artritis reumatoide acompañante de osteoporosis), artritis reumatoide acompañante de destrucción de hueso, hipercalcemia cancerosa, mieloma múltiple acompañante de destrucción de hueso o metástasis de cáncer a hueso, tumor de células gigantes, osteopenia, pérdida de dientes debido a periodontitis, osteólisis alrededor de una articulación prostética, destrucción de hueso en osteomielitis crónica, enfermedad de los huesos de Paget, osteodistrofia renal y osteogénesis imperfecta.

En la invención, la "muestra de prueba" que ha de ser usada para examinar el nivel de expresión del gen de Siglec-15 y/o Siglec-15 se refiere a una muestra de un tejido de médula ósea, hueso, próstata, testículos, pene, vejiga, riñón, cavidad oral, faringe, labios, lengua, encías, nasofaringe, esófago,

estómago, intestino delgado, intestino grueso, colon, hígado, vesícula biliar, páncreas, nariz, pulmón, tejido blando, piel, mama, útero, ovario, cerebro, tiroides, nodo linfático, músculo, tejido graso o similar, o sangre, un fluido corporal, una excreción, o similar obtenido de un sujeto de prueba, un espécimen clínico, etc., sin embargo, en la invención, la sangre o médula ósea es más preferida.

En cuanto a RANKL que se sabe que está asociado con diferenciación de osteoclastos, se ha producido un ratón knockout, y se ha analizado el fenotipo cuando se ha perdido la función de RANKL (Young-Yun Kong, et. al., Nature (1999) 397, pp. 315-323). Al producir un ratón knockout desprovisto de Siglec-15 de la misma manera que antes, se puede analizar el fenotipo cuando se ha perdido la función de Siglec-15.

3. Producción de anticuerpo anti-Siglec-15

El anticuerpo de la invención, que es contra Siglec-15, se puede obtener inmunizando a un animal con Siglec-15 o un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de Siglec-15, y recolectando y purificando el anticuerpo producido *in vivo* de conformidad con un procedimiento común. La especie biológica de Siglec-15 que se ha de usar como un antígeno no se limita al ser humano, y un animal puede ser inmunizado con Siglec-15 derivado de un animal distinto de los humanos tales como un ratón o una rata. En este caso, al examinar la reactividad cruzada entre un anticuerpo que se une al Siglec-15 heterólogo obtenido y Siglec-15 humano, un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana se puede seleccionar.

Además, un anticuerpo monoclonal se puede obtener fusionando células productoras de anticuerpo que producen un anticuerpo contra Siglec-15 con células de mieloma para establecer un hibridoma de conformidad con un método conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, (1975) 256, pp. 495-497;

Kennet, R. ed., Monoclonal Anticuerpos, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

Incidentalmente, Siglec-15 que se ha de usar como un antígeno se puede obtener por ingeniería genética para causar que una célula hospedera produzca el gen de Siglec-15.

De manera específica, un vector capaz de expresar gen de Siglec-15 es producido, y el vector resultante es transfectado en una célula hospedera para expresar el gen, y después el Siglec-15 expresado es purificado. De aquí en adelante, un método para obtener un anticuerpo contra Siglec-15 se describirá de manera específica.

(1) Preparación de antígeno

Ejemplos del antígeno que se ha de usar para producir el anticuerpo anti-Siglec-15 incluyen Siglec-15, un polipétido que comprende una secuencia de aminoácidos parcial que contiene por lo menos 6 aminoácidos consecutivos de Siglec-15, y un derivado obtenido al añadir una secuencia dada de aminoácidos o vehículo para el mismo.

Siglec-15 puede ser purificado directamente de tejidos tumorales o células tumorales humanos y puede ser usado. Además, Siglec-15 se puede obtener sintetizándolo *in vitro* o haciendo que una célula hospedera lo produzca mediante ingeniería genética.

Con respecto a la ingeniería genética, específicamente, el ADNc de Siglec-15 es integrado a un vector capaz de expresar ADNc de Siglec-15 y el Siglec-15 es sintetizado en una solución que contiene una enzima, un sustrato, y una sustancia de energía requerida para transcripción y traducción, u otra célula hospedera procariótica o eucariótica es transformada para expresar Siglec-15, por lo que se puede obtener el antígeno.

Además, el antígeno también se puede obtener como una proteína

secretora al expresar una proteína de fusión obtenida ligando el dominio extracelular de Siglec-15, que es una proteína de membrana, a la región constante de un anticuerpo en un sistema hospedero-vector apropiado.

El ADNc de Siglec-15 se puede obtener, por ejemplo, por un denominado método de PCR en el cual una reacción en cadena de polimerasa (de aquí en adelante referida como "PCR") se realiza usando una genoteca de ADNc que expresa ADNc de Siglec-15 como una plantilla y iniciadores que específicamente amplifican ADNc de Siglec-15 (véase Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pp. 487-489).

Como la síntesis *in vitro* del polipéptido, por ejemplo, Rapid Translation System (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc. Se puede ejemplificar, pero no se limita al mismo.

Ejemplos del hospedero procariótico incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para transformar la célula hospedera con un gen objetivo, la célula hospedera es transformada usando un vector de plásmido que contiene un replicón, es decir, un origen de replicación derivado de una especie compatible con el hospedero, y una secuencia reguladora. Además, el vector preferiblemente tiene una secuencia capaz de imponer selectividad fenotípica sobre la célula transformada.

Ejemplos de la célula hospedera eucariótica include células de vertebrados, células de insectos y células de levadura. Como las células e vertebrados, por ejemplo, cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) de células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), los fibroblastos de murino NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), y células de ovario de hámster chino (CHO células; ATCC: CCL-61); y similares a menudo se usan, sin embargo, no se limitan a las mismas.

El transformante así obtenido puede ser cultivado de conformidad con un procedimiento común, y cultivando el transformante, un polipéptido objetivo es producido intracelularmente o extracelularmente.

Un medio adecuado que se ha de usar para el cultivo se puede seleccionar de varios medios de cultivo comúnmente usados dependiendo de la célula hospedera utilizada. Si se utiliza *Escherichia coli*, por ejemplo, un medio LB complementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG según sea necesario se puede usar.

Una proteína recombinante producida intracelularmente o extracelularmente por el transformante a través de dicho cultivo puede ser separada y purificada por cualquiera de varios métodos de separación conocidos utilizando la propiedad física y química de la proteína.

Ejemplos específicos de los métodos incluyen el tratamiento con un precipitante de proteína común, ultrafiltración, varios tipos de cromatografía de líquidos tales como cromatografía de tamiz molecular (filtración de gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio de iones, y cromatografía de afinidad, diálisis, y una combinación de los mismos.

Además, al unir una etiqueta de seis residuos de histidina a una proteína recombinante que ha de ser expresada, la proteína puede ser eficientemente purificada con una columna de afinidad de níquel. Alternativamente, al unir una región de Fc de IgG a una proteína recombinante que ha de ser expresada, la proteína puede ser eficientemente purificada con una columna de proteína A.

Al combinar los métodos antes mencionados, una gran cantidad de un polipéptido específico puede ser fácilmente producido en rendimiento alto y pureza alta.

(2) Producción de anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15

Ejemplos del anticuerpo que se une específicamente a Siglec-15 incluyen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Siglec-15, y un método para obtener el anticuerpo como se describe más adelante.

La producción de un anticuerpo monoclonal generalmente requiere los siguientes pasos operacionales de:

(a) purificar un biopolímero que se ha de usar como un antígeno;

(b) preparar células productoras de anticuerpo al inmunizar un animal mediante inyección del antígeno, recolectar la sangre, probar su título de anticuerpo para determinar cuando el bazo ha de ser extirpado;

(c) preparar células de mieloma (de aquí en adelante referidas como "mieloma");

(d) fusionar las células productoras de anticuerpo con el mieloma;

(e) determinar selectivamente un grupo de hibridomas que producen un anticuerpo objetivo;

(f) dividir los hibridomas en clones de células individuales (clonación);

(g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal al que se ha implantado el hibridoma para producir una gran cantidad de un anticuerpo monoclonal;

(h) examinar el anticuerpo monoclonal así producido para actividad biológica y especificidad de unión, o probar el mismo para propiedades como un reactivo marcado; y similares.

De aquí en adelante, el método para producir un anticuerpo monoclonal se describirá en detalle siguiendo los pasos anteriores, sin embargo, el método no se limita a los mismos y, por ejemplo, las células productoras de anticuerpo y mieloma se pueden usar distintas de las células del bazo.

(a) Purificación de antígeno

Como el antígeno, Siglec-15 preparado por el método como se describió antes o un péptido parcial del mismo se puede usar.

Además, una fracción de membrana preparada de células recombinantes que expresan Siglec-15 o las células recombinantes que expresan Siglec-15 mismas, y también un péptido parcial de la proteína de la invención químicamente sintetizado por un método conocido por los expertos en la técnica también se puede usar como el antígeno.

(b) Preparación de células productoras de anticuerpo

El antígeno obtenido en el paso (a) se mezcla con un adyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, o sulfato de aluminio potasio y la mezcla resultante se usa como un inmunógeno para inmunizar un animal experimental. Como el animal experimental, cualquier animal usado en un método de producción de hibridoma conocido se puede usar sin ningún problema. De manera específica, por ejemplo, un ratón, una rata, una cabra, oveja, ganado vacuno, un caballo, o similar se pueden usar. Sin embargo, desde el punto de vista de facilidad de disponibilidad de células de mieloma para ser fusionadas con las células productoras de anticuerpo extraídas, un ratón o una rata es preferiblemente usado como el animal que ha de ser inmunizado.

Además, la cepa de ratón o rata que se ha de usar no está particularmente limitada, y en el caso de un ratón, por ejemplo, se pueden usar varias cepas tales como A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, y 129, y en el caso de una rata se pueden usar, por ejemplo, Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer, y similares.

Estos ratones y ratas están comercialmente disponibles de

reproductores/distribudores de animales experimentales, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

Entre éstos, en consideración de compatibilidad de fusión con células de mieloma como se describe más adelante, en el caso de un ratón, cepa BALB/c, y en el caso de una rata, cepas Wistar y Low son particularmente preferidas como el animal que ha de ser inmunizado.

Además, en consideración de homología antigénica entre humanos y ratones, también se prefiere usar un ratón que tiene función biológica disminuida para remover autoanticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmune.

La edad del ratón o rata en el tiempo de inmunización es preferiblemente 5 a 12 semanas de edad, muy preferiblemente 6 a 8 semanas de edad.

A fin de inmunizar un animal con Siglec-15 o un recombinante del mismo, por ejemplo, un método conocido descrito en detalle en, por ejemplo, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964), o similar se puede usar.

Entre estos métodos de inmunización, un método específico preferido en la invención es, por ejemplo, como sigue.

Es decir, primero, una fracción de proteína de membrana que sirve como el antígeno o células causadas para expresar el antígeno es/son intradérmicamente o intraperitonealmente administrada a un animal.

Sin embargo, la combinación de ambas vías de administración es preferida para incrementar la eficiencia de inmunización, y cuando la administración intradérmica se realiza en la primera mitad y administración

intraperitoneal se realiza en la última mitad o sólo en la última dosificación, la eficiencia de inmunización puede ser particularmente incrementada.

El programa de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal que ha de ser inmunizado, diferencias individuales, o similares. Sin embargo, en general, un programa de administración en el cual la frecuencia de administración del antígeno es 3 a 6 veces y el intervalo de dosificación es 2 a 6 semanas es preferido, y un programa de administración en el cual la frecuencia de administración del antígeno es 3 a 4 veces y el intervalo de dosificación es 2 a 4 semanas es más preferido.

Además, la dosis del antígeno varía dependiendo del tipo de animal que ha de ser inmunizado, diferencias individuales, o similar, sin embargo, la dosis generalmente se fija a 0.05 a 5 mg, preferiblemente aproximadamente 0.1 a 0.5 mg.

Una inmunización de refuerzo se realiza 1 a 6 semanas, preferiblemente 2 a 4 semanas, muy preferiblemente 2 a 3 semanas después de la administración del antígeno como se describió antes.

La dosis del antígeno en el tiempo de realizar la inmunización de refuerzo varía dependiendo del tipo o tamaño del animal o similar, sin embargo, en el caso de un ratón, la dosis es generalmente fijada a 0.05 a 5 mg, preferiblemente 0.1 a 0.5 mg, muy preferiblemente aproximadamente 0.1 a 0.2 mg.

Las células del bazo o linfocitos que incluyen células productoras de anticuerpo son asépticamente removidas del animal inmunizado 1 a 10 días, preferiblemente 2 a 5 días, muy preferiblemente 2 a 3 días después de la inmunización de refuerzo.

En este tiempo, el título de anticuerpo se mide, y si un animal que tiene un título de anticuerpo suficientemente incrementado se usa como una fuente de suministro de células productoras de anticuerpo, el procedimiento

subsecuente se puede llevar a cabo de manera más eficiente.

Ejemplos del método de medir el título de anticuerpo para usarse aquí incluyen un método de RIUn y un método de ELISA, pero el método no está limitado al mismo.

Por ejemplo, si se utiliza un método de ELISA, la medición del título de anticuerpo en la invención se puede llevar a cabo de conformidad con los procedimientos como se describe más adelante.

Primero, un antígeno purificado o parcialmente purificado es adsorbido sobre la superficie de una fase sólida tal como una placa de 96 pozos para ELISA, y la superficie de la fase sólida que no tiene antígeno adsorbido a la misma es cubierta con una proteína no relacionada con el antígeno tal como albúmina de suero de bovino (de aquí en adelante referida como "BSA"). Después de lavar la superficie, la superficie se lleva a contacto con una muestra serialmente diluida (por ejemplo, suero de ratón) como un anticuerpo primario para permitir que el anticuerpo en la muestra se una al antígeno.

Además, como un anticuerpo secundario, un anticuerpo marcado con una enzima contra un anticuerpo de ratón se añade y se deja unir al anticuerpo de ratón. Después del lavado, un sustrato para la enzima se añade y un cambio en absorbancia que ocurre debido a desarrollo de color inducido por degradación del sustrato o similar se mide y el título de anticuerpo se calcula con base en la medición.

La separación de células productoras de anticuerpo de las células del bazo o linfocitos se puede llevar a cabo de conformidad con un método conocido (por ejemplo, Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977), 6, p. 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550; Walsh, Nature (1977), 266, p. 495).

Por ejemplo, en el caso de células del bazo, un método general en el

cual las células productoras de anticuerpo son separadas al homogeneizar el bazo para obtener células a través de filtración con una rejilla de acero inoxidable y suspendiendo las células en un medio esencial mínimo de Eagle (MEM) se puede utilizar.

(c) Preparación de células de mieloma (de aquí en adelante referida como "mieloma")

Las células de mieloma que se han de usar para fusión de células no son particularmente limitadas y células adecuadas se pueden seleccionar de líneas de células conocidas. Sin embargo, en consideración de conveniencia cuando un hibridoma se selecciona de células fusionadas, se prefiere usar una cepa deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina fosforibosilo transferasa) cuyo procedimiento de selección se ha establecido.

Muy específicamente, ejemplos de la cepa deficiente en HGPRT incluyen X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), F0, S149/5XXO, y BU.1 derivada de ratones; 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) derivada de ratas; y U266AR(SKO-007), GM1500·GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) y 8226AR/NIP4-1(NP41) derivada de humanos.

Estas cepas deficientes en HGPRT están disponibles de, por ejemplo, el American Type Culture Collección (Depósito Norteamericano de Cultivos Tipo; ATCC) o similar.

Estas cepas de células son subcultivadas en un medio apropiado tal como un medio de 8-azaguanina [un medio obtenido al añadir 8-azaguanina a un medio RPMI-1640 complementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina y suero de ternera fetal (de aquí en adelante referida como "FCS")]; medio de modificado por Iscove (de aquí en adelante referido como "IMDM"), o medio de Tagle modificado por Dulbecco (de aquí en adelante referido como "DMEM"). En

este caso, 3 a 4 días antes de realizar fusión de células, las células son subcultivadas en un medio normal [por ejemplo, un medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.) que contiene 10% de FCS] para obtener no menos de 2×10^7 células en el día de fusión de células.

(d) Fusión de células

La fusión entre las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma se puede realizar apropiadamente de conformidad con un método conocido (Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publicaciones, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), etc.), bajo condiciones tales que la tasa de supervivencia de células no es excesivamente reducida.

Como tal, un método, un método químico en el cual las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma se mezclan en una solución que contiene un polímero tal como polietilenglicol a una concentración alta, un método físico que usa estimulación eléctrica, o similar se puede usar.

Entre estos métodos, un ejemplo específico del método químico es como se describe más adelante.

Es decir, en el caso en donde polietilenglicol se usa en la solución que contiene un polímero a una concentración alta, las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma se mezclan en una solución de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 1500 a 6000, muy preferiblemente 2000 a 4000 a una temperatura de 30 a 40°C, preferiblemente de 35 a 38°C durante 1 a 10 minutos, preferiblemente 5 a 8 minutos.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

El método de seleccionar hibridomas obtenidos por la fusión de células antes mencionada no es particularmente limitado. Usualmente, un método de selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550) se usa.

Este método es efectivo cuando se obtienen hibridomas usando las células de mieloma de una cepa deficiente en HGPRT que no pueden sobrevivir en presencia de aminopterina.

Es decir, cultivando células no fusionadas e hibridomas en un medio HAT, sólo se deja que hibridomas resistentes a aminopterina selectivamente sobrevivan y proliferen.

(f) División en clon de células individuales (clonación)

Como un método de clonación para hibridomas, un método conocido tal como un método de metilcelulosa, un método de agarosa blanda, o un método de dilución limitante se pueden usar (véase, por ejemplo, Barbara, B. M. y Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Entre estos métodos, particularmente, se prefiere un método de dilución limitante.

En este método, una cepa de células de fibroblasto derivadas de un feto de ratón o células alimentadoras tales como células de bazo de ratón normales, células de glándula del timo, o células de ascitos se siembran en una microplaca.

Mientras tanto, los hibridomas se diluyen en un medio para dar una densidad de células de 0.2 a 0.5 células por 0.2 ml. Una alícuota de 0.1 ml de la suspensión de hibridoma diluido se añade a cada pozo y el cultivo se continúa durante aproximadamente 2 semanas mientras se reemplaza aproximadamente 1/3 de la solución de cultivo con medio fresco a intervalos de tiempo

predeterminados (por ejemplo, cada 3 días), por lo que los clones del hibridoma puede ser proliferados.

Los hibridomas en pozos para los cuales el título de anticuerpo ha sido confirmado son sometidos a, por ejemplo, clonación por el método de dilución limitante repetidamente 2 a 4 veces. Un hibridoma que ha sido confirmado para tener un título de anticuerpo estable se selecciona como una cepa de hibridoma productora de anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15.

Ejemplos de la cepa de hibridoma así clonada incluye hibridoma #32A1 descrita en WO 09/48072. El hibridoma #32A1 se depositó en el International Patent Organism Depositary de la National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Depósito Internacional de Organismos de Patente del Intituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, localizado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 28 de agosto de 2008, y se ha dado un número de acceso de FERM BP-10999 bajo el nombre de Hibridoma #32A1 anti-Siglec-15. Incidentalmente, en esta descripción, el anticuerpo producido por el hibridoma #32A1 se refiere como "anticuerpo #32A1" o simplemente "#32A1". Además, los anticuerpos obtenidos en los ejemplos de esta descripción distintos del anticuerpo #32A1 también están representados por los nombres de anticuerpo de la misma manera. Un fragmento parcial que contiene la región variable de cadena pesada del anticuerpo #32A1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 167 de SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias. Además, un fragmento parcial que contiene la secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo #32A1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 139 de SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias.

(g) Preparación de anticuerpo monoclonal cultivando hibridoma

Al cultivar el hibridoma así seleccionado, un anticuerpo monoclonal se puede obtener eficientemente. Sin embargo, antes del cultivo, se prefiere realizar determinación selectiva de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal objetivo.

En esa determinación selectiva, se puede utilizar un método conocido.

La medición del título de anticuerpo en la invención se puede llevar a cabo, por ejemplo, por un método de ELISA explicado en el punto (b) descrito anteriormente.

El hibridoma obtenido por el método descrito anteriormente se puede almacenar en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un congelador a -80°C o inferior.

Después de completarse la clonación, el medio es cambiado de un medio HT a un medio normal, y el hibridoma es cultivado.

El cultivo a gran escala se realiza mediante cultivo por rotación usando una botella para cultivo grande o mediante cultivo giratorio.

Del sobrenadante obtenido por el cultivo a gran escala, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína de la invención se puede obtener por purificación usando un método conocido por los expertos en la técnica tal como filtración en gel.

Además, el hibridoma es inyectado en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma (por ejemplo, el BALB/c antes mencionado) o un ratón Nu/Nu para proliferar el hibridoma, por lo que se pueden obtener los ascitos que contenían una gran cantidad del anticuerpo monoclonal de la invención.

En el caso en donde el hibridoma es administrado en la cavidad abdominal, si un aceite mineral tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano

(pristano) es administrado 3 a 7 días antes del mismo, se puede obtener una cantidad más grande de los ascitos.

Por ejemplo, un inmunosupresor es previamente inyectado en la cavidad abdominal de un ratón de la misma pieza que el hibridoma para inactivat las células T. 20 días después, 10^6 a 10^7 células de clon de hibridoma se suspenden en un medio libre de suero (0.5 ml), y la suspensión es inyectada en la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen es expandido y llenado con los ascitos, los ascitos se recolectan del ratón.

Por este método, el anticuerpo monoclonal se puede obtener a una concentración que es aproximadamente 100 veces o más alta que en la solución de cultivo.

El anticuerpo monoclonal obtenido por el método antes mencionado puede ser purificado por un método descrito, por ejemplo, en Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publicaciones, Oxford (1978).

Es decir, ejemplos del método incluyen un método de precipitación de sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio de iones, y cromatografía de afinidad.

Como un método de purificación simple, también se puede usar un kit de purificación de anticuerpo monoclonal comercialmente disponible (por ejemplo, MAbTrap GII Kit fabricado por Pharmacia, Inc.) o similar.

El anticuerpo monoclonal así obtenido tiene alta especificidad de antígeno para Siglec-15.

(h) Prueba de anticuerpo monoclonal

El isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal así obtenido se pueden determinar como sigue.

Primero, ejemplos del método de identificación incluyen un método

de Ouchterlony, un método de ELISA y un método de RIUn.

Un método de Ouchterlony es simple, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, se requiere una operación de condensación.

Por otra parte, cuando se usa un método de ELISA o un método de RIUn, al hacer reaccionar directamente el sobrenadante de cultivo con una fase sólida antígeno-adsorbida y usando anticuerpos correspondientes a varios tipos de isotipos y subclases de inmunoglobulina como anticuerpos secundarios, el isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal se pueden identificar.

Además, como un método más simple, también se puede usar un kit de identificación comercialmente disponible (por ejemplo, Mouse Typer Kit fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) o similar.

Además, la determinación cuantitativa de una proteína se puede realizar por el método de Folin Lowry y un método de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm [1.4 (DO 280) = Inmunoglobulina 1 mg/ml].

(3) Otros anticuerpos

El anticuerpo de la invención incluye no sólo el anticuerpo monoclonal antes mencionado contra Siglec-15, sino también un anticuerpo recombinante obtenido por modificación artificial para el propósito de reducir la antigenicidad heteróloga a humanos tales como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos se pueden producir usando un método conocido.

Como el anticuerpo quimérico, un anticuerpo en el cual las regiones variable y constante de anticuerpo se derivan de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en el cual una región variable de anticuerpo derivado de ratón o rata es conectada a una región constante derivada de humano puede ser ejemplificada (véase Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)). Como un

ejemplo del anticuerpo quimérico derivado de un anticuerpo #32A1 anti-ratón de rata, se puede ejemplificar un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de SEQ ID NO: 41 en el listado de secuencias y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 237 de SEQ ID NO: 43 en el listado de secuencias.

Como el anticuerpo humanizado, se puede ejemplificar un anticuerpo obtenido al integrar sólo una región determinante de complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado de humano (véase Nature (1986) 321, pp. 522-525), y un anticuerpo obtenido al injertar una parte de los residuos de aminoácidos del marco de trabajo así como la secuencia de CDR a un anticuerpo humano por un método de injerto de CDR (WO 90/07861). Como un ejemplo del anticuerpo humanizado de un anticuerpo de rata #32A1, se puede ejemplificar una combinación arbitraria de una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 51 en el listado de secuencias, residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 53, residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 55, residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 57, residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 59, residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 99, residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 101, o residuos de aminoácidos 1 a 121 de cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 72 a 77 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 61, residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 63, residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 65, residuos de aminoácidos 21 a 132 de SEQ ID NO: 67, residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 69, residuos de aminoácidos 21 a 133

de SEQ ID NO: 71, residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 103, residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 105, o residuos de aminoácidos 1 a 113 de cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 78 a 96.

Como una combinación preferida, se puede ejemplificar un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 61, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 63, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 55 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 65, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 55 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 132 de SEQ ID NO: 67, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable

de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 57 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 69, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 71, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 99 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 69, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 101 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 69, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 99 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 103, o un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que

comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de SEQ ID NO: 99 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de SEQ ID NO: 105.

Como una combinación más preferida, se puede ejemplificar un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de SEQ ID NO: 61, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de SEQ ID NO: 63, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de SEQ ID NO: 55 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de SEQ ID NO: 65, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de SEQ ID NO: 55 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 237 de SEQ ID NO: 67, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de SEQ ID NO: 57 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de SEQ ID NO: 69, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 470 de SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de

SEQ ID NO: 71, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 466 de SEQ ID NO: 99 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de SEQ ID NO: 69, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 466 de SEQ ID NO: 101 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de SEQ ID NO: 69, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 466 de SEQ ID NO: 99 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de SEQ ID NO: 103, o un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20 a 466 de SEQ ID NO: 99 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21 a 238 de SEQ ID NO: 105.

Sin embargo, el anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo #32A1 no se limita a los anticuerpos humanizados antes mencionados siempre que el anticuerpo humanizado tenga todos los 6 tipos de secuencias de CDR de #32A1 y tenga una actividad de inhibir la formación de osteoclastos. Incidentalmente, la región variable de cadena pesada del anticuerpo #32A1 tiene CDRH1 (DYFMN) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 44, cualquiera de CDRH2 (QIRNKIYTYATFYAESLEG) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 45 y CDRH2 (QIRNKIYTYATFYA) representada por SEQ ID NO: 97, y CDRH3 (SLTGGDYFDY) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46. La CDRH2 representada por SEQ ID NO: 45 es de conformidad con la definición de Kabat (SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL

INTEREST VOL. I, QUINTA EDICIÓN (1991)). La CDRH2 representada por SEQ ID NO: 97 se hace más corta por cinco residuos en el C-terminal que la definición de Kabat. En la secuencia de cadena pesada que contiene esta CDRH2, la secuencia de CDR derivada de una rata se hace más corta y más de una secuencia de marco de trabajo humana es incorporada, y por lo tanto, cuando se administra a humanos, es mucho menos probable que sea reconocida como un antígeno heterólogo. Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo #32A1 tiene CDRL1 (RASQSVTISGYSFIH) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 47, CDRL2 (RASNLAS) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48, y CDRL3 (QQSRKSPWT) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 49.

Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano. Un anticuerpo anti-Siglec-15 humano se refiere a un anticuerpo humano que tiene sólo una secuencia de gen de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano. El anticuerpo anti-Siglec-15 humano se puede obtener por un método que usa un ratón productor de anticuerpo humano que tiene un fragmento de cromosoma humano que contiene genes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, pp. 722-727, etc.).

Dicho ratón productor de anticuerpo humano se puede crear específicamente como sigue. Un animal genéticamente modificado en el cual loci de genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena han sido alterados, y en su lugar, se han introducido loci de genes de cadena pesada y

ligera de inmunoglobulina humana mediante un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC) o similar es creado al producir un animal knockout y un animal transgénico y apareando estos animales.

Además, de conformidad con una técnica de ingeniería genética, usando ADNcs que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo humano, respectivamente, y preferiblemente un vector que contiene los ADNcs, células eucarióticas son transformadas, y un transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante es cultivado, por lo que el anticuerpo también se puede obtener del sobrenadante de cultivo.

Aquí, como el hospedero, por ejemplo, se pueden usar células eucarióticas, preferiblemente células de mamífero tales como células CHO, linfocitos o células de mieloma.

Además, también se conoce un método para obtener un anticuerpo humano derivado de despliegue de fagos determinado selectivamente de una genoteca de anticuerpo humano (véase Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., Opthalmology (2002) 109 (3), pp. 427-431, etc.).

Por ejemplo, se puede usar un método de despliegue de fagos en el cual una región variable de un anticuerpo humano es expresada sobre la superficie de un fago como un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), y un fago que se une a un antígeno se selecciona (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116).

Al analizar el gen del fago seleccionado basado en la unión a un antígeno, se puede determinar una secuencia de ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humano que se une a un antígeno.

Si la secuencia de ADN de scFv que se une a un antígeno se

determina, un anticuerpo humano se puede obtener al preparar un vector de expresión que tiene la secuencia e introducir el vector en un hospedero apropiado a expresarlo (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388, Annu. Rev. Immunol (1994) 12, pp. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).

Los anticuerpos obtenidos por el método anterior son evaluados para la propiedad de unión a un antígeno por el método descrito en el ejemplo 25 o similar, y un anticuerpo preferido se puede seleccionar. Como un ejemplo de otro índice cuando se comparan las propiedades de anticuerpos, la estabilidad de anticuerpos se puede ejemplificar. La calorimetría de escudriñamiento diferencial (DSC) mostrada en el ejemplo 33 es un instrumento capaz de medir rápido y de manera precisa una temperatura de punto medio de desnaturalización térmica (Tm) que es un índice favorable de estabilidad estructural relativa de las proteínas. Al medir los valores de Tm usando DSC y al comparar los valores, una diferencia en estabilidad térmica se puede comparar. Se sabe que la estabilidad al almacenamiento de los anticuerpos muestra alguna correlación con la estabilidad térmica de los anticuerpos (Lori Burton, et. al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, pp. 265-273), y un anticuerpo preferido se puede seleccionar al usar estabilidad térmica como un índice. Ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen lo siguiente: el rendimiento en una célula hospedera apropiada es alto y la capacidad de agregación en una solución acuosa es baja. Por ejemplo, un anticuerpo que muestra el rendimiento más alto no siempre muestra estabilidad térmica alta, y por lo tanto, es necesario seleccionar un anticuerpo más adecuado para administrar a humanos al hacer una evaluación completa basada en los índices antes mencionados.

Además, un método en el cual las secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa de un anticuerpo son ligadas usando un enlazador

apropiado, por el que se obtiene una inmunoglobulina de cadena sencilla también es conocido (Lee, H-S, et. al., Molecular Immunology (1999) 36, pp. 61-71; Shirrmann, T. et. al., mAbs (2010), 2, (1) pp. 1-4). Al dimerizar la inmunoglobulina de cadena sencilla, el dímero resultante puede tener una estructura y una actividad similar a las de un anticuerpo que es un tetrámero como tal. Además, el anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo que tiene una región variable de cadena pesada sencilla y no tiene una secuencia de cadena ligera. Dicho anticuerpo se denomina un anticuerpo de dominio sencillo (sdAb) o un nanocuerpo, y de hecho, se observa en camellos y llamas y se ha reportado que tiene una afinidad de unión a antígeno (Muyldemans S. et. al., Protein Eng. (1994) 7(9), 1129-35, Hamers-Casterman C. et. al., Nature (1993) 363 (6428) 446-8). Se puede entender que los anticuerpos antes mencionados son tipos de fragmentos funcionales del anticuerpo de conformidad con la invención.

Además, al controlar la glicosilación en la cual un glicano se une al anticuerpo de la invención, es posible incrementar la actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo. En lo que respecta a técnicas para controlar la glicosilación de anticuerpos, se conocen los documentos WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, etc. Sin embargo, las técnicas no se limitan a éstos.

En casos en donde un anticuerpo es producido aislando primero un gen de anticuerpo y después introduciendo el gen en el hospedero apropiado, se pueden usar una combinación de un hospedero apropiado y un vector de expresión apropiado. Ejemplos específicos del gen de anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo descrita en esta descripción y un gen que codifica una secuencia de cadena ligera del mismo. Cuando una célula hospedera es transformada, es posible insertar el gen de la secuencia de cadena pesada y el gen de la secuencia de cadena ligera en el mismo vector de expresión, y también en diferentes

vectores de expresión por separado. En casos en donde se usan células eucarióticas como el hospedero, se pueden usar células animales, células vegetales y microorganismos eucarióticos. Como las células animales, (1) células de mamífero, por ejemplo, cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) de células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos de murino NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), y células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61); pueden ser ejemplificadas. Además, en casos en donde se usan células procarióticas, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* pueden ser ejemplificadas. Al introducir un gen de anticuerpo objetivo en estas células a través de transformación, y al cultivar las células así transformadas *in vitro*, se puede obtener el anticuerpo. En el método de cultivo antes mencionado, el rendimiento algunas veces puede variar dependiendo de la secuencia del anticuerpo, y por lo tanto, es posible seleccionar uno que sea fácilmente producido como un compuesto farmacéutico al usar el rendimiento como un índice entre los anticuerpos que tienen una actividad de unión comparable.

No hay limitación sobre el isotipo del anticuerpo de la invención, y ejemplos de los mismos incluyen IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD e IgE, y ejemplos preferidos de los mimos incluyen IgG e IgM, y además, ejemplos más preferidos de los mismos incluyen IgG1 e IgG2.

Además, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento funcional del anticuerpo que tiene un sitio de unión a antígeno del anticuerpo o un fragmento modificado del mismo. El fragmento del anticuerpo se puede obtener al tratar el anticuerpo con una proteasa tal como papaína o pepsina, o al modificar el gen del anticuerpo de conformidad con una técnica de ingeniería genética y expresando el gen modificado en células cultivadas adecuadas. Entre estos

fragmentos de anticuerpo, un fragmento que tiene todas o parte de las funciones de la molécula del anticuerpo de longitud completa se puede llamar un fragmento funcional del anticuerpo. Como las funciones del anticuerpo, generalmente una actividad de unión a antígeno, una actividad de neutralización de la actividad de un antígeno, una actividad de incremento de la actividad de un antígeno, una actividad citotóxica dependiente de anticuerpo, una actividad citotóxica dependiente de complemento y actividad citotóxica celular dependiente de complemento se pueden ejemplificar. La función del fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la invención es una actividad de unión a Siglec-15, preferiblemente una actividad de inhibir la formación de osteoclastos, muy preferiblemente una actividad de inhibir el proceso de fusión celular de los osteoclastos.

Ejemplos del fragmento del anticuerpo incluyen Fab, F(ab')2, Fv, Fv de cadena sencilla (scFv) en el cual moléculas de Fv de la cadena pesada y la cadena ligera son ligadas mediante un enlazador apropiado, un diacuerpo (diacuerpos), un anticuerpo lineal, y un anticuerpo poliespecífico compuesto del fragmento de anticuerpo. Además, Fab' que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenido mediante tratamiento de F(ab')2 bajo condiciones reductoras es también considerado como un fragmento del anticuerpo.

Además, el anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo poliespecífico con especificidad para por lo menos dos antígenos diferentes. En general, dicha molécula se une a dos antígenos (es decir, un anticuerpo biespecífico), sin embargo, el "anticuerpo poliespecífico", como se usa aquí, incluye un anticuerpo que tiene especificidad para dos o más (por ejemplo, tres) antígenos.

El anticuerpo poliespecífico de la invención puede ser un anticuerpo

de longitud completa o un fragmento de dicho anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico F(ab')2). El anticuerpo biespecífico puede ser producido al ligar las cadenas pesada y ligera (pares de HL) de dos tipos de anticuerpos, o también puede ser producido al fusionar hibridomas que producen diferentes anticuerpos monoclonales para preparar células fusionadas productoras de anticuerpo biespecífico (Millstein et al., Nature (1983) 305, pp. 537-539).

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo de cadena sencilla (también referido como scFv). El anticuerpo de cadena sencilla se puede obtener al ligar la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo mediante un enlazador de polipétido (Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Anticuerpos, 113 (editado por Rosenburg y Moore, Springer Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Nature Biotechnology (2005), 23, pp. 1126-1136). Además, un fragmento de BiscFv producido al ligar dos moléculas de scFv mediante un enlazador de polipétido también se puede usar como el anticuerpo biespecífico.

EL método para producir un anticuerpo de cadena sencilla se conoce en este campo técnico (véase, por ejemplo, patentes de E.U.A. Nos. 4,946,778, 5,260,203, 5,091,513, 5,455,030, etc.). En este scFv, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera son ligadas mediante un enlazador que no forma un conjugado, preferiblemente mediante un enlazador de polipétido (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, pp. 5879-5883). En el scFv, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se pueden derivar del mismo anticuerpo o diferentes anticuerpos.

Como el enlazador de polipéptido que se ha de usar para ligar las regiones variables, por ejemplo, se usa un péptido de cadena sencilla dado compuesto de 12 a 19 residuos.

ADN que codifica scFv se puede obtener al realizar amplificación

usando un ADN que codifica la secuencia entera de aminoácidos, o una secuencia parcial deseada de aminoácidos, seleccionados de la cadena pesada o la región variable de cadena pesada del anticuerpo antes mencionado y la cadena ligera o la región variable de cadena ligera del mismo como una plantilla por un método de PCR usando un par de iniciadores que define ambos extremos de la misma, y además realizando amplificación al combinar el ADN que codifica una porción de enlazador de polipétido y un par de iniciadores que define ambos extremos de la misma para ligar los dos extremos a la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente.

Además, una vez que el ADN que codifica scFv es producido, un vector de expresión que contiene el mismo y un hospedero transformado por el vector de expresión se puede obtener de conformidad con procedimientos comunes. Además, al usar el hospedero resultante, scFv se puede obtener de conformidad con procedimientos comunes. Un fragmento de anticuerpo del mismo se puede producir en un hospedero al obtener un gen y al expresar el gen de la misma manera como se describió antes.

El anticuerpo de la invención puede ser multimerizado para incrementar su afinidad para un antígeno. El anticuerpo que ha de ser multimerizado puede ser un tipo de anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos que reconocen una pluralidad de epítopes del mismo antígeno. Como un método de multimerización del anticuerpo, se puede ejemplificar la unión del dominio CH3 de IgG a dos moléculas de scFv, unión a estreptavidina, introducción de un motivo de hélice-vuelta-hélice y similares.

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo policlonal que es una mezcla de tipos plirales de anticuerpos anti-Siglec-15 que tienen diferentes secuencias de aminoácidos. Como un ejemplo del anticuerpo policlonal, se puede ejemplificar una mezcla de tipos plurales de anticuerpos que tienen diferentes

CDR. Como dicho anticuerpo policlonal, se puede usar una mezcla de células que producen diferentes anticuerpos se cultiva, y un anticuerpo purificado del cultivo resultante (véase WO 2004/061104).

Como un anticuerpo modificado, se puede usar un anticuerpo unido a cualquiera de varios tipos de moléculas tales como polietilenglicol (PEG) también.

Además, el anticuerpo de la invención puede estar en forma de un conjugado formado entre cualquiera de estos anticuerpos y otro agente medicinal (inmunoconjugado). Ejemplos de dicho anticuerpo incluyen uno en el cual el anticuerpo es conjugado a un material radioactivo o un compuesto que tiene una acción farmacológica (Nature Biotechnology (2005) 23, pp. 1137-1146).

El anticuerpo obtenido puede ser purificado a homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo se puede realizar utilizando un método de separación y purificación de proteína convencional. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser separado y purificado al seleccionar y combinar apropiadamente la cromatografía en columna, filtración por filtro, ultrafiltración, precipitación de sal, diálisis, electroforesis de gel de poliacrilamida preparativa, electroforesis de enfoque isoeléctrico, y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero el método no se limita al mismo.

Ejemplos de dicha cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, y cromatografía de adsorción.

Dicha cromatografía se puede realizar utilizando cromatografía de líquidos tal como CLAR o FPLC.

Como una columna se puede usar en cromatografía de afinidad, una

columna Protein A y una columna de proteína G se pueden ejemplificar.

Por ejemplo, como una columna que usa una columna Protein A, Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) y similares se pueden ejemplificar.

Además, al usar un vehículo que tiene un antígeno inmovilizado en el mismo, el anticuerpo también se puede purificar utilizando la propiedad de unión del anticuerpo al antígeno.

4. Agente farmacéutico que contiene anticuerpo anti-Siglec-15

De los anticuerpos anti-Siglec-15 obtenidos por el método descrito en el anterior punto "3. Producción de anticuerpo anti-Siglec-15", se puede obtener un anticuerpo que neutraliza la actividad biológica de Siglec-15. Dicho anticuerpo que neutraliza la actividad biológica de Siglec-15 inhibe la actividad biológica de Siglec-15 *in vivo*, es decir, la diferenciación y/o maduración de osteoclastos, y por lo tanto se puede usar como un agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo anormal de hueso causado por diferenciación y/o maduración anormal de osteoclastos como un agente farmacéutico. El metabolismo anormal de hueso puede ser cualquier trastorno caracterizado por pérdida neta de hueso (osteopenia u osteólisis). En general, el tratamiento y/o prevención por el anticuerpo anti-Siglec-15 son/es aplicado a un caso en donde la inhibición de resorción de hueso es requerida. Ejemplos del metabolismo anormal de hueso que se puede tratar y/o prevenir por el anticuerpo anti-Siglec-15 incluyen osteoporosis (osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis senil, osteoporosis secundaria debido al uso de un agente terapéutico tal como un esteroide o un inmunosupresor, o artritis reumatoide acompañante de osteoporosis), artritis reumatoide acompañante de destrucción de hueso, hipercalcemia cancerosa, mieloma múltiple acompañante de destrucción de hueso o metástasis de cáncer a hueso, tumor de células gigantes, osteopenia, pérdida de dientes debido a

periodontitis, osteólisis alrededor de una articulación prostética, destrucción de hueso en osteomielitis crónica, enfermedad de los huesos de Paget, osteodistrofia renal, y osteogénesis imperfecta, sin embargo, el metabolismo anormal de hueso no está limitado a las mismas siempre que sea una enfermedad acompañada por pérdida neta de hueso causada por osteoclastos. Ejemplos del anticuerpo anti-Siglec-15 que se ha de usar como el agente farmacéutico antes mencionado incluyen un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado producido a partir del anticuerpo #32A1 por el método descrito en el punto 3. "(3) Otros anticuerpos". Además, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano que comparten el mismo epítope que el anticuerpo #32A1 también se pueden usar como un agente farmacéutico. El que un cierto anticuerpo anti-Siglec-15 comparta el mismo epítope que el anticuerpo #32A1 se puede confirmar al observar si estos anticuerpos se unen o no al mismo péptido parcial específico de Siglec-15. Además, también se puede determinar que si un cierto anticuerpo anti-Siglec-15 compite con el anticuerpo #32A1 para unión a Siglec-15, estos anticuerpos comparten el mismo epítope.

La actividad *in vitro* del anticuerpo anti-Siglec-15 de neutralizar la actividad biológica de Siglec-15 se puede determinar, por ejemplo, por la actividad de inhibir la diferenciación de las células que sobreexpresan Siglec-15 en osteoclastos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Siglec-15 se añade a células RAW 264.7 o células RAW 264 que son una línea de células derivadas de monolitos de ratón a varias concentraciones, y la actividad de inhibir la diferenciación en osteoclastos por estimulación con RANKL o TNF-α se puede determinar. Además, el anticuerpo anti-Siglec-15 se añade a células cultivadas primarias derivadas de médula ósea a varias concentraciones, y la actividad de inhibir la diferenciación en osteoclastos por estimulación con RANKL, TNF-α, o vitamina D_3 activa se puede determinar. Además, el anticuerpo anti-Siglec-15 se añade a células precursoras

de osteoclastos humanos normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, disponible de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) a varias concentraciones, y la actividad de inhibir la diferenciación en osteoclastos por estimulación con RANKL o M-CSF se puede determinar. Dicho efecto inhibidor sobre la diferenciación de osteoclastos se puede determinar usando la inhibición de al actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de osteoclastos como un índice. Además, el efecto inhibidor sobre la diferenciación de osteoclastos también se puede determinar usando la inhibición de formación de osteoclastos multinucleados TRAP-positivos, es decir, la inhibición de fusión celular de osteoclastos como un índice. Además, en un experimento que utiliza una prueba de fosa (Takada et al., Bone and Mineral, (1992) 17, 347-359) usando células derivadas de fémur y/o tibia, la actividad *in vitro* de inhibir la resorción de hueso por osteoclastos se puede determinar añadiendo el anticuerpo anti-Siglec-15 a células derivadas de fémur y/o tibia a varias concentraciones, y observando la formación de fosa en una rebanada de dentina. Como un sistema para determinar la actividad *in vitro* de inhibir la resorción de hueso por osteoclastos, es también posible usar una placa revestida con colágeno humano conjugado a europio. El efecto terapéutico o preventivo *in vivo* del anticuerpo anti-Siglec-15 sobre el metabolismo anormal de hueso usando un animal experimental se puede confirmar administrando el anticuerpo anti-Siglec-15 a un modelo animal de osteoporosis o un animal transgénico que sobreexpresa Siglec-15 y midiendo cualquier cambio en osteoclastos.

El anticuerpo así obtenido que neutraliza la actividad biológica de Siglec-15 es útil como un agente farmacéutico, particularmente como una composición farmacéutica para tratar o prevenir el metabolismo anormal de hueso tales como osteoporosis, artritis reumatoide acompañante de destrucción de hueso, o metástasis de cáncer a hueso acompañante de destrucción de hueso, o

como un anticuerpo parar diagnóstico inmunológico de dicha enfermedad.

En el tratamiento de artritis reumatoide (RA), un problema mayor es pérdida de hueso que acompaña la ocurrencia de la enfermedad. Se ha reportado que en esta pérdida de hueso que acompaña RA, los osteoclastos juegan un papel primario. Las citocinas consideradas como las más importantes para inducción de osteoclastos (diferenciación y maduración) y la activación y como la causa de destrucción de hueso en RA son RANKL y TNF-α (Romas E. et al., Bone 30, pp. 340-346, 2002). OCIF/OPG que es un receptor de señuelo para RANKL puede inhibir la formación de osteoclastos inducida por RANKL pero no inhibe la formación de osteoclastos inducida por TNF-α. Por otra parte, el anticuerpo anti-Siglec-15 de conformidad con la invención efectivamente inhibió la formación de osteoclastos inducida por RANKL y TNF-α. Por lo tanto, se espera que el anticuerpo anti-Siglec-15 de la invención puede inhibir la pérdida de hueso y destrucción de hueso inducida por TNF-α en RA o similar más fuertemente que un bloqueador de RANKL (OCIF/OPG, un anticuerpo anti-RANKL o similar).

Como un ejemplo, para el tratamiento o prevención de metabolismo anormal de hueso, el anticuerpo anti-Siglec-15 se puede administrar sola o en combinación con por lo menos otro agente terapéutico para una enfermedad relacionada con hueso. Como otro ejemplo, el anticuerpo anti-Siglec-15 se puede administrar en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente terapéutico para el metabolismo anormal de hueso. Ejemplos del agente terapéutico que se puede administrar en combinación con el anticuerpo anti-Siglec-15 incluyen, pero no se limitan a: bisbifosfonatos (por ejemplo, alendronato, etidronato, ibandronato, incadronato, pamidronato, risedronato y zoledronato), vitamina D_3 activa, calcitonina y derivados de los mismos, hormonas tales como estradiol, SERMs (moduladores de receptor de estrógeno selectivos), ipriflavona, vitamina K_2 (menatetrenona), preparaciones de calcio, PTH (hormona

paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, celecoxib y rofecoxib), receptores de TNF solubles (por ejemplo, etanercept), anticuerpos anti-TNF-α o fragmentos funcionales de los anticuerpos (por ejemplo, infliximab), anti-PTHrP (proteína relacionada con hormona paratiroidea) anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos, antagonistas de receptor de IL-1 (por ejemplo, anakinra), anticuerpos anti-receptor de IL-1 o fragmentos funcionales de los anticuerpos (por ejemplo, tocilizumab), anticuerpos anti-RANKL o fragmentos funcionales de los anticuerpos (por ejemplo, denosumab), y OCIF (factor inhibidor de osteoclastogénesis). Dependiendo del estado de metabolismo anormal de hueso o el grado pretendido del tratamiento y/o prevención, dos o tres, o más tipos de agentes medicinales se pueden administrar, y estos agentes medicinales se pueden administrar todos juntos encapsulándolos en la misma preparación. Estos agentes medicinales y el anticuerpo anti-Siglec-15 pueden ser suministrados todos juntos encapsulándolos en la misma preparación. Además, estos agentes medicinales pueden ser suministrados todos juntos encapsulándolos como un kit que se ha de usar para el tratamiento y/o prevención. Además, estos agentes medicinales y el anticuerpo anti-Siglec-15 pueden ser suministrados por separado. En el caso de administración en terapia génica, un gen de un agente terapéutico proteináceo para una enfermedad de los huesos y un gen del anticuerpo anti-Siglec-15 se pueden insertar hacia el extremo 3' de la misma región de promotor o diferentes regiones de promotor, y se pueden introducir en el mismo vector o diferentes vectores.

Al conjugar un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos al anticuerpo anti-Siglec-15 o un fragmento del mismo, un conjugado de fármaco objetivo como se describe en M. C. Garnet "Targeted drug conjugates: principles and progress", Advanced Drug Delivery Reviews, (2001) 53, 171-216 puede ser producido. Para lograr este propósito, otra molécula distinta al

anticuerpo, cualquier fragmento de anticuerpo se puede aplicar siempre que no pierda completamente la capacidad para reconocer osteoclastos, y ejemplos de los mismos incluyen fragmentos tales como Fab, F(ab')2, y Fv. En la invención, el anticuerpo y el fragmento se pueden usar de la misma manera. El conjugado formado por el anticuerpo anti-Siglec-15 o un fragmento del mismo y un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos puede ser cualquiera de varias formas descritas en M. C. Garnet "Targeted drug conjugates: principles and progress", Advanced Drug Delivery Reviews, (2001) 53, 171-216, G. T. Hermanson "Bioconjugate Techniques" Academic Press, California (1996), Putnam y J. Kopecek "Polymer Conjugates con Anticancer Activity" Advances in Polymer Science (1995) 122, 55-123 y similares. Es decir, un conjugado en el cual el anticuerpo anti-Siglec-15 y un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos son conjugados uno a otro químicamente y directamente o mediante un separador tal como un oligopéptido y un conjugado formado por un vehículo de fármaco apropiado puede ser ejemplificado. Ejemplos del vehículo de fármaco incluyen un liposoma y un polímero soluble en agua. Ejemplos más específicos del conjugado formados por dicho vehículo de fármaco incluyen un conjugado en el cual el anticuerpo y un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos se incorporan en un liposoma y el liposoma y el anticuerpo se conjugan uno otro, y un conjugado en el cual un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos es conjugado a un polímero soluble en agua (un compuesto que tiene un peso molecular de aproximadamente 1000 a 100000) químicamente y directamente o mediante un separador tal como un oligopéptido y el anticuerpo es conjugado al polímero soluble en agua. La conjugación del anticuerpo (o un fragmento del mismo) a un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos o un vehículo de fármaco tal como un liposoma o un polímero soluble en agua se puede efectuar por un método conocido por los expertos en la técnica tal como el método descrito

en G. T. Hermanson "Bioconjugate Techniques" Academic Press, California (1996), Putnam y J. Kopecek "Polymer Conjugates con Anticancer Activity" Advances in Polymer Science (1995) 122, 55-123. La incorporación de un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos en un liposoma se puede efectuar por un método conocido por los expertos en la técnica tal como el método descrito en D. D. Lasic "Liposomes: From Physics to Applications" Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1993) o similar. La conjugación de un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos a un polímero soluble en agua puede ser efectuada por un método conocido por los expertos en la técnica tal como el método descrito en D. Putnam y J. Kopecek "Polymer Conjugates con Anticancer Activity" Advances in Polymer Science (1995) 122, 55-123. Un conjugado del anticuerpo (o un fragmento del mismo) y un agente terapéutico proteináceo para una enfermedad de los huesos (o un fragmento del mismo) puede ser producido por métodos conocido por los expertos en la técnica a través de ingeniería genética distinto del método antes mencionado.

La invención también provee una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente y/o preventivamente efectiva del anticuerpo anti-Siglec-15 y un diluyente, vehículo, agente solubilizante, agente emulsionante, conservador y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La invención también provee una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente y/o preventivamente efectiva del anticuerpo anti-Siglec-15, una cantidad terapéuticamente y/o preventivamente efectiva de por lo menos un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos, y un diluyente, vehículo, agente solubilizante, agente emulsionante, conservador y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos del agente terapéutico para una enfermedad de los huesos incluyen, pero no se limitan a, bisbifosfonatos (por ejemplo, alendronato, etidronato, ibandronato, incadronato,

pamidronato, risedronato y zoledronato), vitamina D_3 activa, calcitonina y derivados de los mismos, hormonas tales como estradiol, SERMs (moduladores de receptor de estrógeno selectivos), ipriflavona, vitamina K_2 (menatetrenona), preparaciones de calcio, PTH (hormona paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, celecoxib y rofecoxib), receptores de TNF solubles (por ejemplo, etanercept), anticuerpos anti-TNF-α o fragmentos funcionales de los anticuerpos (por ejemplo, infliximab), anticuerpos anti-PTHrP (proteína relacionada con hormona paratiroidea) o fragmentos funcionales de los anticuerpos, antagonistas de receptor de IL-1 (por ejemplo, anakinra), anticuerpos anti-receptor de IL-1 o fragmentos funcionales de los anticuerpos (por ejemplo, tocilizumab), anticuerpos anti-RANKL o fragmentos funcionales de los anticuerpos (por ejemplo, denosumab) y OCIF (factor inhibidor de osteoclastogénesis).

Una sustancia que se ha de usar en una preparación aceptable en la composición farmacéutica de conformidad con la invención es preferiblemente no tóxica a una persona a quien la composición farmacéutica ha de ser administrada en términos de la dosis y concentración.

La composición farmacéutica de la invención puede contener una sustancia para uso farmacéutico que es capaz de cambiar o mantener el pH, presión osmótica, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, condición aséptica, estabilidad, solubilidad, velocidad de liberación, velocidad de absorción, y permeabilidad de la misma. Ejemplos de dicha sustancia para uso farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, arginina y lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, sulfato de sodio, y sulfito ácido de sodio; reguladores de pH tales como reguladores de pH de fosfato, citrato, borato, bicarbonato de sodio, y soluciones de Tris-HCl; llenadores tales como manitol y glicina; agentes quelatadores tales como etilendiamino tetraacetato (EDTA); agentes formadores

de complejo tales como cafeína, polivinilpirrolidina, β-ciclodextrina e hidroxipropil-β-ciclodextrina; expansores tales como glucosa, manosa y dextrina; otros carbohidratos tales como monosacáridos y disacáridos; agentes colorantes; sabores; diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidina; conservadores tales como polipéptidos de peso molecular bajo, contraiones formadores de sal, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno; solventes tales como glicerina, propilenglicol y polietilenglicol; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; agentes de suspensión; agentes tensoactivos tales como éster de sorbitán, polisorbatos incluyendo polisorbato 20 y polisorbato 80, Triton, trometamina, lecitina y colesterol; agentes incrementadores de estabilidad tales como sacarosa y sorbitol; agentes incrementadores de elasticidad tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, y manitol y sorbitol; agentes de transporte; excipientes; y/o adyuvantes farmacéuticos. La cantidad de estas sustancias añadidas para uso farmacéutico es preferiblemente de 0.01 a 100 veces, particularmente preferiblemente de 0.1 a 10 veces el peso del anticuerpo anti-Siglec-15. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente una formulación preferida de la composición farmacéutica en una preparación dependiendo de la enfermedad a la cual se aplica la composición, la vía de administración, o similar.

El excipiente o vehículo en la composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido o un sólido. Un excipiente o vehículo apropiado puede ser agua inyectable, solución salina fisiológica, un fluido espinal cerebral artificial, u otra sustancia comúnmente usada para administración parenteral. Además, la solución salina fisiológica neutra o solución salina fisiológica que contiene albúmina de suero también se puede usar como un vehículo. La composición farmacéutica puede contener un regulador de pH Tris de pH 7.0 a 8.5, un

regulador de pH de acetato de pH 4.0 a 5.5, o un regulador de pH de citrato de pH 3.0 a 6.2. Además, el regulador de pH puede ser complementado con sorbitol u otro compuesto. Ejemplos de la composición farmacéutica de la invención incluyen una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 y una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 y por lo menos un agente terapéutico para una enfermedad de los huesos. La composición farmacéutica de la invención se prepara en forma de un producto liofilizado o un líquido como un agente medicinal que tiene una composición seleccionada y una pureza requerida. La composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 y la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 y por lo menos un agente terapéutico para el metabolismo anormal de hueso también se puede formar en un producto liofilizado usando un excipiente apropiado tal como sacarosa.

La composición farmacéutica de la invención se puede preparar para administración parenteral o para absorción gastrointestinal a través de administración oral. La composición y concentración de una preparación se puede determinar dependiendo del método de administración. Mientras más alta es la afinidad del anticuerpo anti-Siglec-15 contenido en la composición farmacéutica de la invención es para Siglec-15, es decir, mientras más baja es la constante de disociación (valor de Kd) del mismo es para Siglec-15, más el anticuerpo anti-Siglec-15 puede mostrar su eficacia de fármaco aun cuando reduce la dosis para humanos. Por lo tanto, la dosis de la composición farmacéutica de la invención para humanos también se puede determinar con base en esta consideración. En cuanto a la dosis, en el caso en donde un anticuerpo anti-Siglec-15 humano es administrado a humanos, el anticuerpo puede ser administrado a una dosis de aproximadamente 0.1 a 100 mg/kg una vez por uno a 180 días.

Ejemplos de la forma de dosis de la composición farmacéutica de la

invención incluyen inyecciones incluyendo infusiones, supositorios, agentes transnasales, agentes sublinguales y absorbentes percutáneos.

EJEMPLOS

De aquí en adelante, la invención se describirá más específicamente con referencia a los ejemplos, sin embargo, la invención no se limita a la misma. Nótese que las operaciones respectivas con respecto a manipulación de genes en los siguientes ejemplos se realizaron de conformidad con los métodos descritos en "Molecular Cloning" (escrito por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press en 1989), o en el caso de usando reactivos o kits comercialmente disponibles, se usan de conformidad con los protocolos unidos a los mismos a menos que se indique otra cosa.

EJEMPLO 1

Producción de constructo de expresión de proteína Siglec-15 soluble de ratón

Una secuencia parcial de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de proteína Siglec-15 de ratón está representada por SEQ ID NO: 5 en el listado de secuencias y una secuencia de aminoácidos de la misma está representada por SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias. Al utilizar una secuencia parcial, la proteína Siglec-15 soluble de ratón se puede producir en un sobrenadante de cultivo de una célula animal o similar.

a) Amplificación de gen de Siglec-15 soluble de ratón por PCR

Como iniciadores para amplificar el ADNc del dominio extracelular de

Siglec-15 de ratón por PCR, un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccATGGAG GGGTCCCTCC AACTC-3' (mSiglec-15-ECD-F: SEQ ID NO: 7 en el listado de secuencias); y un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc TCCGGGGGCG CCGTGGAAGC GGAAC-3' (mSiglec-15-ECD-R: SEQ ID NO: 8 en el listado de secuencias) se sintetizaron de conformidad con un procedimiento común. Incidentalmente, estos iniciadores se diseñaron como iniciadores de amplificación para producir un clon de entrada de Gateway, de tal manera que una secuencia de attB1 se añade a mSiglec-15-ECD-F y una secuencia de attB2 se añade a mSiglec-15-ECD-R. El PCR se realizó usando esta combinación de iniciadores y un polinucleótido que contiene una secuencia de marco de lectura abierta del ratón Siglec-15 com una plantilla de conformidad con un procedimiento común. Las condiciones para un ciclador térmico se establecieron como sigue: después de calentar a 94°C durante 5 minutos, un ciclo de temperatura de "94°C durante 0.5 minutos, 55°C durante 0.5 minutos y 68°C durante 1.5 minutos" se repitió 15 veces, seguido por calentamiento a 68°C durante 5 minutos e incubando a 4°C.

b) Producción de clon de entrada por reacción de Gateway BP

Un clon de entrada en el cual el ADNc de dominio extracelular de Siglec-15 de ratón fue integrado por la tecnología Gateway (Invitrogen, Inc.) utilizando un sistema de recombinación específico del sitio de fago lambda fue producido por el siguiente método. Primero, una reacción de BP que usa BP Clonase se realizó entre el producto de PCR que tiene una secuencia de attB en ambos extremos producidos en a) y pDNOR221 (fabricado por Invitrogen, Inc.) que es un vector donador que tiene una secuencia de attP. Al usar esta solución de reacción, *Escherichia coli* DH10B fue transformada, PCR de colonia se realizó

para clones resistentes a fármacos, y el tamaño de insertos fue confirmado. Después, para un clon que se confirmó que tenía un inserto con el tamaño correcto, se realizó un análisis de secuencia de la secuencia de ADN total del inserto. Como resultado, se obtuvo un clon de entrada que es completamente idéntico a la secuencia objetivo de nucleótidos (SEQ ID NO: 5 en el listado de secuencias) que codifica el dominio extracelular de la proteína Siglec-15 de ratón.

c) Producción de clon de expresión por reacción de Gateway LR

Un clon de expresión en el cual el ADNc de dominio extracelular de Siglec-15 de ratón fue integrado por la tecnología Gateway (Invitrogen, Inc.) utilizando un sistema de recombinación específico del sitio de fago lambda fue producido por el siguiente método. El clon de entrada producido en b) contiene un inserto que tiene una secuencia de attL en ambos extremos. Una reacción de LR usando LR Clonase se realizó entre este clon de entrada y dos tipos de vectores de destino que tienen una secuencia de attR. Incidentalmente, como los vectores de destino, dos tipos de vectores de destino: pDONM diseñados de tal manera que una etiqueta de epítope V5 y una etiqueta 6 x His se añaden al C terminal del inserto; y phIgFc diseñado de tal manera que una etiqueta Fc humana se añade al C terminal del inserto se usaron. Al usar la solución de reacción obtenida por la reacción LR, *Escherichia coli* DH10B fue transformada, y PCR de colonia se realizó para los clones resistentes a fármaco obtenidos, y el tamaño de los insertos fue confirmado. Después, para un clon que se confirmó que tenía un inserto con el tamaño correcto, se realizó un análisis de secuencia de ambos extremos del lado del inserto al lado del vector.

Secuencias de iniciador para análisis de secuencia:

5'-tgcgtgaagg tgcagggcag-3' (mSiglec-15-ECD-seq-upstm: SEQ ID NO: 9 en el listado de secuencias)

y

5'-cctcgcctgg tcgggtc-3' (mSiglec-15-ECD-seq-dnstm: SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias)

Como resultado de la análisis de secuencia, se obtuvieron los clones de expresión (Siglec-15/pDONM soluble de ratón y Siglec-15/phIgFc soluble de ratón) en el cual la recombinación correcta ocurrió tanto para pDONM como para phIgFc, respectivamente. Al transferir el Siglec-15/pDONM soluble de ratón en una célula animal o similar, el ARNm que tiene una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 11 en el listado de secuencias es transcrito y traducido en una proteína (Siglec-15-His de ratón) que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 12 en el listado de secuencias. Además, al transfectar el Siglec-15/phIgFc soluble de ratón a una célula animal o similar, el ARNm que tiene una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 13 en el listado de secuencias es transcrito y traducido en una proteína (Siglec-15-Fc de ratón) que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 14 en el listado de secuencias.

EJEMPLO 2

La preparación a gran escala de solución de cultivo que contiene proteína Siglec-15 soluble de ratón con el uso de células 293-F

Los dos tipos de vectores de expresión (Siglec-15/pDONM soluble de ratón y Siglec-15/phIgFc soluble de ratón) obtenido en el ejemplo 1 se preparó en una cantidad de aproximadamente 5 mg, respectivamente. Incidentalmente, en la purificación de plásmidos de *Escherichia coli* cultivados a gran escala, se usó Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Gigaprep Kit (fabricado por Invitrogen, Inc.). El plásmido así preparado se mezcló con Opti-MEM (fabricado por Invitrogen, Inc.), la mezcla resultante fue esterilizada por filtración, 10 ml de un reactivo de transfección 293fectin (fabricado por Invitrogen, Inc.) se añadió a la misma, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Esta mezcla se añadió a células FreeStyle 293-F (fabricadas por Invitrogen, Inc.) cultivadas en matraces Erlenmeyer de tal manera que la densidad de células alcanzó 1.1 x 10^6 células/ml x 5 L (1 L/matraz x 5 matraces) en medio FreeStyle 293 Expression Medium (fabricado por Invitrogen, Inc.). Después de que las células habían sido sometidas a cultivo con agitación (125 rotaciones/min) a una concentración de CO_2 de 8.0% durante 96 horas (4 días) a 37°C, la solución de cultivo se recolectó y se centrifugó para preparar un sobrenadante de cultivo. Se considera que en el sobrenadante de cultivo así preparado, una proteína en la cual una etiqueta de epítope V5 y una His tag 6x se han añadido al lado C-terminal del dominio extracelular Siglec-15 de ratón (Siglec-15-His de ratón) y una proteína en la cual una etiqueta Fc humana se ha añadido al lado C-terminal del dominio extracelular Siglec-15 de ratón (Siglec-15-Fc de ratón) se expresan, respectivamente.

EJEMPLO 3

Purificación de Siglec-15-His de ratón

a) Cromatografía en columna HisTrap HP

A 2 L de la solución de cultivo de células 293F que expresan Siglec-15-His de ratón preparadas en el ejemplo 2, 225 mL de regulador de pH 10 x (500 mM Tris, 1.5 M NaCl, 200 mM imidazol, pH 8.0) se añadió, y la mezcla resultante se agitó bien y se filtró a través de un filtro Sterivex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Esta solución de cultivo se aplicó a una velocidad de flujo de 2 ml/min a una columna que comprendía tres columnas de HisTrap HP 5 ml (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) conectadas en serie y se trató anteriormente con un agente removedor de pirógeno PyroCLEAN (fabricado por ALerCHEK, Inc.) y se lavó con agua destilada para inyección. Después de que la columna se lavó con 60 ml de regulador de pH 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) que contenía 300 mM NaCl a una velocidad de flujo de 1 ml/min, una proteína adsorbida a la columna se eluyó con 50 ml de regulador de pH 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) que contenía 300 mM NaCl y 500 mM imidazol a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El producto eluido fue fraccionado a 1 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.) a los cuales se había añadido previamente 10 µl de 10% Tween 20. Después de aproximadamente 20 ml de una solución obtenida al combinar las fracciones (fracciones 14 a 20) y que contenía la proteína eluida se concentró a 2.5 ml con un concentrador de membrana centrífuga Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el concentrado se aplicó a una columna de destilación PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con solución salina regulada en su pH con fosfato que contenía 0.01% Tween 20 (T-PBS), seguido por elución con T-PBS, por lo que se obtuvo 3.5 ml de una muestra cuyo solvente fue reemplazado por T-PBS.

b) Cromatografía en columna Resource Q

A 3.5 ml de la muestra que fue purificada por cromatografía en columna HisTrap HP y cuyo solvente fue reemplazado por T-PBS, 22.5 ml de regulador de pH 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) que contenía 0.1% CHAPS se añadió y la mezcla resultante se agitó. Después, la mezcla se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 3,000 rpm y el precipitado fue removido. Después de que el sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro Millex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el filtrado se aplicó a una velocidad de flujo de 1 ml/min a una columna Resource Q 6 ml (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con regulador de pH 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) que contenía 0.1% CHAPS. Por lo tanto, la columna se lavó con este regulador de pH a una velocidad de flujo de 1 ml/min y una fracción de proteína que no fue adsorbida a la columna fue recolectada. Una proteína adsorbida a la columna se eluyó con regulador de pH 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) que contenía 0.1% CHAPS y 1 M NaCl a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Después de 26.5 ml de la fracción que no fue adsorbida a la columna se concentró a 2.0 ml con un concentrador de membrana centrífuga Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el concentrado se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 3,000 rpm y el precipitado fue removido. El sobrenadante después de la centrifugación fue crioconservado a –80°C hasta usarse. El procedimiento de purificación antes mencionado (cromatografía en columna HisTrap HP y cromatografía en columna Resource Q) se realizó al repetirlo dos veces.

c) Detección y prueba de pureza de Siglec-15-His purificada de ratón

Al usar una muestra preparada por el procedimiento de purificación antes mencionado (cromatografía en columna HisTrap HP y cromatografía en

columna Resource Q), se realizó electroforesis de SDS-poliacrilamida bajo condiciones reductoras y tinción con plata. Es decir, a 5 μl de cada una de las muestras purificada por los pasos de purificación respectivos, se añadió una cantidad equivalente de una solución de tratamiento de SDS, y la mezcla resultante se trató térmicamente a 95°C durante 10 minutos. 0.3 μl de cada una de las muestras térmicamente tratadas se usó para electroforesis de SDS-poliacrilamida. Como un gel para electroforesis, se usó un gel de gradiente de poliacrilamida de 8-25% (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.), y la electroforesis se realizó usando PhastSystem (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.). Además, como marcadores de peso molecular, se usaron Rainbow Molecular Weight Markers (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.). Después de completarse la electroforesis, la tinción con plata se realizó usando PhastGel Silver Kit (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y PhastSystem. Los resultados se muestran en la figura 1. Se mostró que una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 35 kDa (Siglec-15-His de ratón) fue eficientemente purificada y concentrada en la fracción de proteína que no fue adsorbida a la columna Resource Q.

La electroforesis se realizó bajo las mismas condiciones excepto que ECL DualVue Western Blotting Markers (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) se usaron como los marcadores de peso molecular, y la proteína en el gel fue transferido (blott) a una membrana de PVDF (Hybond-P, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) usando un PhastTransfer Semi-dry Transfer Kit (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y PhastSystem. Esta membrana de PVDF se agitó suavemente en 10 ml de un agente bloqueador (BlockAce, fabricado por Snow Brand Milk Products, Co., Ltd.) que contenía 0.1% Tween 20 a temperatura ambiente durante 1 hora. A esta solución de bloqueo, 10 μl de S-proteína HRP (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y 10 μl de un anticuerpo anti-V5-HRP

(anticuerpo monoclonal para Pk-TAG-HRP, fabricado por Acris Anticuerpos) se añadieron y la membrana en la solución se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 1 hora adicional. La membrana de PVDF se lavó 4 veces al agitarlo suavemente en 50 mL de fosfato-regulador de solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS) que contenía 0.01% Tween 20 durante 5 minutos. Después del lavado, la membrana de PVDF se trató de conformidad con el protocolo que acompañó un kit de detección ECL (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) para revelar el color de la banda de la proteína, y el color revelado se detectó usando una ECL Mini-Camera (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y película Polaroid (Polapan 3200B, fabricado por Polaroid, Inc.). Los resultados se muestran en la figura 2. También a partir de estos resultados, se pudo confirmar que una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 35 kDa (Siglec-15-His de ratón) y reacciona con un anticuerpo anti-V5-HRP fue eficientemente purificada y concentrada en la fracción de proteína que no fue adsorbida a la columna Resource Q.

d) Medición de concentración de proteína de Siglec-15-His purificada de ratón

Para la Siglec-15-His purificada de ratón (la fracción de proteína que no fue adsorbida a la columna Resource Q), la concentración de proteína se midió con un kit de prueba de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) usando albúmina de suero de bovino como una muestra estándar. Como se muestra en el cuadro 1, un total de 1.66 mg de proteína Siglec-15-His purificada de ratón se obtuvo al realizar el procedimiento de purificación dos veces.

CUADRO 1

	Concentración de proteína (mg/ml)	Volumen de la muestra. (ml)	Total de proteína (mg)
1er	0.475	2.0	0.95
2°	0.354	2.0	0.71
Total			1.66

EJEMPLO 4

Purificación de Siglec-15-Fc de ratón

a) Proteína en columna HiTrap Protein A

1.8 L de la solución de cultivo de células 293F que expresan Siglec-15-Fc de ratón preparada en el ejemplo 2 se filtró a través de un filtro Sterivex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.), y después el filtrado se aplicó a una columna HiTrap Protein A 5 ml (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con PBS de Dulbecco (D-PBS, fabricado por Invitrogen, Inc.) a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Después de que la columna se lavó con D-PBS a una velocidad de flujo de 5 ml/min, una proteína adsorbida a la columna se eluyó con 50 ml de regulador de pH de 0.1 M citrato de sodio (pH 3.0) a una velocidad de flujo de 5 ml/min. El material eluido se fraccionó a 5 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, 1.3 ml de 1 M Tris se añadió al mismo para neutralizar el material eluido. Después de que una solución obtenida al combinar las fracciones (fracciones 1 y 2) en la cual la proteína eluida fue detectada se concentró a 2.5 ml con un concentrador de membrana centrífuga Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el concentrado se aplicó a una columna de desalación PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con Otsuka solución salina fisiológica para inyección (TO-SS, fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) que contenía 0.01% Tween 20, seguida por elución con TO-SS, por lo que 3.5 ml de una muestra cuyo solvente fue reemplazado por TO-

SS se obtuvo. Esta muestra fue crioconservada a –80°°C hasta usarse. Al usar 2.9 L de una solución de cultivo de células 293F, el mismo procedimiento de purificación se realizó al repetirlo una vez más.

b) Detección y prueba de pureza de Siglec-15-Fc purificada de ratón

Al usar una muestra preparada por el procedimiento de purificación antes mencionado, se realizaron electroforesis de SDS-poliacrilamida bajo condiciones reductoras y tinción con plata. Es decir, a 5 μl de cada una de las muestras purificada por los pasos de purificación respectivos, una cantidad equivalente de una solución de tratamiento de SDS se añadió, y la mezcla resultante se calentó a 95°C durante 10 minutos. 0.3 μl de un a muestra obtenida al diluir cada una de las muestras térmicamente tratadas a 1/300 ó 1/900 con una concentración media de la solución de tratamiento de SDS se usó para electroforesis de SDS-poliacrilamida. La electroforesis y tinción con plata se realizaron de la misma manera que la prueba de pureza de Siglec-15-His de ratón descrita en c) del ejemplo 3. Los resultados se muestran en la figura 3 junto con los resultados del examen de condiciones de purificación preliminar a escala pequeña (el pH de la solución de cultivo aplicada fue 8.9 ó 7.0). Se mostró que una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 55 kDa (Siglec-15-Fc de ratón) fue eficientemente purificada y concentrada en la fracción de proteína que se eluyó de la columna de HiTrap Protein A.

c) Medición de concentración de proteína de Siglec-15-Fc purificada de ratón

Para la Siglec-15-Fc urificada de ratón (la fracción de proteína eluida de la columna de desalación PD-10), la concentración de proteína se midió con un kit de prueba de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) usando

albúmina de suero de bovino como una muestra estándar. Como se muestra en el cuadro 2, un total de 92 mg de proteína Siglec-15-Fc purificada de ratón se obtuvo al realizar el procedimiento de purificación dos veces.

CUADRO 2

	Concentración de proteína (mg/ml)	Volumen de la muestra. (ml)	Total de proteína (mg)
1er	8.0	3.5	28
2°	18.5	3.5	64
Total			92

EJEMPLO 5

Establecimiento de hibridoma productor de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata

a) Preparación de antígeno

La proteína Siglec-15-His de ratón producida en el ejemplo 3 se preparó a 100 μg/0.5 ml, y una cantidad equivalente de un adyuvante se añadió a la misma y una emulsión se produjo usando una jeringa de vidrio. Como el adyuvante, adyuvante completo de Freund (FCA, fabricado por Difco Laboratories, Inc.) se usó sólo para la primera inmunización, y adyuvante incompleto de Freund (FICA, fabricado por Difco Laboratories, Inc.) se usó para la segunda inmunización y posteriormente.

b) Inmunización de rata

Cuatro ratas (Wistar, hembras, 6 semanas de edad, comprado de CLEA Japan, Inc.) se usaron como animales inmunizados. La emulsión obtenida en a) se inyectó subcutáneamente e intradérmicamente usando una aguja de inyección de 27 G de tal manera que la cantidad del antígeno fue 50 μg por rata.

La inmunización se realizó un total de 4 veces cada 7 días después de la primera inmunización. Una pequeña cantidad (200 μl) de la sangre fue recolectada de la vena de la cola después de 7 días desde la fecha de la 4ª. inmunización, y se preparó un antisuero. Para confirmar el título de anticuerpo del antisuero, ELISA que usaba la proteína Siglec-15-His de ratón que se había usado como el antígeno, la proteína Siglec-15-Fc de ratón producida en el ejemplo 4, o albúmina de suero de bovino (BSA), cada una de las cuales fue inmovilizada, se realizó. Como resultado, la reactividad con la proteína Siglec-15-His de ratón y la proteína Siglec-15-Fc de ratón se observó en todas las cuatro ratas (ratas Nos. 1 a 4). Por otra parte, la reactividad con BSA no se observó. De estos resultados, se confirmó que el título de anticuerpo en el suero de cada una de las ratas inmunizadas se incrementó, y por lo tanto, la rata No. 2 que mostró el título de anticuerpo más alto fue sometida a un procedimiento de fusión celular.

c) Fusión celular

Se realizó fusión celular de conformidad con un método común de fusión de células de bazo de ratón (rata) con células de mieloma. La sangre entera fue recolectada del corazón de la rata bajo anestesia con éter y la rata fue sacrificada, y después el bazo fue extirpado. Las células del bazo recolectadas y células P3X63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) que son células de mieloma de ratón fueron sometidas a fusión celular usando polietilenglicol (PEG). Las células resultantes se sembraron en una placa de 96 pozos, y un medio que contenía hipoxantina (H), aminopterina (A) y timidina (T) (medio de selección de HAT) se añadió a las mismas, y después, las células se cultivaron durante 7 a 10 días. El sobrenadante de cultivo fue recolectado de 61 pozos en los cuales la supervivencia de hibridomas obtenidos por fusión celular fue confirmada. Después, el título de anticuerpo fue evaluado por ELISA usando la proteína Siglec-

15-His de ratón que se había usado como el antígeno, la proteína Siglec-15-Fc de ratón producida en el ejemplo 4, o BSA, cada una de las cuales fue inmovilizada, e hibridomas productores de anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15 de ratón se determinaron selectivamente. A partir de los resultados de la determinación selectiva, 12 pozos que mostraron un título de anticuerpo alto se seleccionaron y los hibridomas contenidos en los pozos fueron sometidos a un procedimiento de clonación.

d) Clonación de hibridoma

Para el hibridoma así seleccionados, se realizó un primer paso de clonación por un método de dilución limitante. Después de la dilución limitante, los hibridomas se cultivaron durante 2 semanas, y el título de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo fue confirmado por ELISA usando la proteína Siglec-15-Fc de ratón producida en el ejemplo 4 o BSA, cada uno de los cuales fue inmovilizado. Para 11 clones que se confirmó que eran clones positivos, se realizó un segundo paso de clonación (de la misma manera que el primer paso de clonación), por lo que 10 clones de los hibridomas productores de anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15 de ratón (#1A1, #3A1, #8A1, #24A1, #32A1, #34A1, #39A1, #40A1, #41B1, #61A1) se establecieron al final. Incidentalmente, el hibridoma #32A1 se depositó en el International Patent Organism Depositary de la National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 28 de agosto de 2008, y se le ha dado un número de acceso de FERM BP-10999 bajo el nombre de anti-Siglec-15 Hybridoma #32A1.

EJEMPLO 6

Preparación de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata

a) Preparación de ascitos de ratón sin pelo

Los hibridomas establecidos en el ejemplo 5 se cultivaron usando medio TIL Media I (fabricado por Immuno-biological Laboratories Co., Ltd.) que contenía 10% FCS. El subcultivo de las células se llevó a cabo al realizar un procedimiento en el cual la solución de cultivo se diluyó a aproximadamente una cuarta parte cada dos a tres días al usar el punto de tiempo cuando las células se hicieron crecer a aproximadamente 5 x 10^5 células/ml como un índice. Cada uno de los hibridomas así cultivados fue implantado intraperitonealmente en un ratón si pelo al cual se había administrado pristano intraperitonealmente (0.2 ml/ratón) previamente a 1 x 10^7 células por ratón. En la implantación, se usaron tres ratones sin pelo para cada uno de los 10 clones de hibridomas. Después de la implantación, los ascitos fueron recolectados cuando se observó suficiente acumulación de ascitos, que se combinaron con aquellos recolectados de los otros dos ratones implantados con el mismo hibridoma, la cantidad de los ascitos así combinados se midió, y los ascitos se crioconservaron hasta la purificación del anticuerpo. Las cantidades de los ascitos recolectados para los hibridomas respectivos se resumen en el cuadro 3.

CUADRO 3

Hibridoma	Cantidad de ascitos recolectados (ml)	Hibridoma	Cantidad de ascitos recolectados (ml)
#1A1	12.5	#34A1	8.2
#3A1	8.0	#39A1	14.5
#8A1	6.0	#40A1	20.3
#24A1	7.8	#41B1	10.5
#32A1	5.5	#61A1	12.3

b) Purificación de anticuerpo

La cantidad total de los ascitos recolectados se sometió a purificación

de IgG usando una columna de 20 ml Protein G (fabricado por GE Healthcare, Co., Ltd.). La IgG purificada se probó para pureza por análisis de filtración en gel (cromatografía en columna Superdex 200), y algunos de los anticuerpos fueron sometidos a concentración de membrana centrífuga. Es decir, entre los anticuerpos monoclonales anti-ratón Siglec-15 purificados, 9 tipos de anticuerpos excepto por el anticuerpo #24A1 se concentraron a aproximadamente una sexta parte a una octava parte del volumen original al centrifugar los anticuerpos a 3,000 rpm durante 30 a 60 minutos a 4°C usando un concentrador de membrana centrífuga Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Subsecuentemente, para el anticuerpo #24A1 y los otros 9 tipos de anticuerpos concentrados, la concentración ed proteína se midió con un kit de prueba de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) usando albúmina de suero de bovino (BSA) como una muestra estándar. Mediante procedimiento antes mencionado, se preparó el anticuerpo anti-ratón Siglec-15 monoclonal.

EJEMPLO 7

Evaluación de propiedad de unión de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata a proteína Siglec-15 de ratón

La propiedad del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata que se une a proteína Siglec-15 de ratón fue evaluada por un método de ELISA. La proteína Siglec-15-Fc de ratón producida en el ejemplo 4 se diluyó a 5 μg/ml con regulador de pH de carbonato de sodio 0.1 M (pH 9.5), y la solución resultante se añadió a una placa de 96 pozos (fabricada por Nalge Nunc International, Inc., Cat. No. 430341) a 100 μl/pozo. Después de que la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución fue removida y un regulador de pH de lavado (solución salina regulada en su pH con fosfato que contiene 0.05% Tween 20) se

añadió a 300 µl/pozo y después se removió. Después de este procedimiento de lavado se realizó una vez más, solución salina regulada en su pH con fosfato que contenía 25% BlockAce (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) se añadió a 200 µl/pozo, y la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, por lo que se realizó bloqueo. El líquido fue removido, y la placa se lavó dos veces con 300 µl/pozo del regulador de pH de lavado. Después, cada uno del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas preparado en el ejemplo 6 o IgG de control de rata (fabricada por R&D Systems, Inc.) se diluyó a una concentración final de 1.28 a 20,000 ng/ml (serie de dilución de 5 veces) con un regulador de pH de ELISA (solución salina regulada en su pH con fosfato que contenía 12.5% de BlockAce y 0.05% de Tween 20), y la solución de anticuerpo diluida resultante se añadió a la placa a 100 µl/pozo. Después de que la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, el líquido fue removido, y la placa se lavó 3 veces con 300 µl/pozo del regulador de pH de lavado. Subsecuentemente, un anticuerpo anti-rat IgG de cabra marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) (fabricado por Beckman Coulter, Inc.) diluido a 1,000 veces con un regulador de pH de ELISA se añadió a 100 µl/pozo, y la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. El líquido fue removido y la placa se lavó 3 veces con 300 µl/pozo del regulador de pH de lavado, y después, usando un kit de revelado de color para peroxidasa (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), el color fue revelado de conformidad con el protocolo que acompañaba al kit. Después de revelar el color, se midió una absorbancia a 492 nm usando un lector de microplaca (fabricado por Nihon Molecular Devices Corporation). Como resultado, se confirmó que todas las 10 muestras de prueba del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas examinadas se unían a la proteína Siglec-15 de ratón de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo (figura 4). Por otra parte, en el caso de la IgG de control de rata, no se observó la unión a la proteína Siglec-15 de ratón.

EJEMPLO 8

Preparación de células no adherentes de médula ósea de ratón

El fémur y tibia se extirparon de un ratón ddY macho de 5 a 8 semanas de edad y los tejidos blandos se removieron. Ambos extremos del fémur o tibia se cortaron, y D-PBS se inyectó usando una jeringa con una aguja de inyección de calibre 25 para extraer células de médula ósea, que fueron recolectadas en un tubo de centrífuga. La centrifugación se realizó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 100 g, y el sobrenadante fue removido. A la pastilla de células resultante, se añadió 1 ml de un regulador de pH hemolítico (Red Blood Cell Lysing Buffer (regulador de pH de lisis de glóbulos rojos), fabricado por Sigma Co., Ltd.) para suspenderlo, y la suspensión resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. 20 ml de D-PBS se añadió a la misma, y la suspensión se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 100 g, y el sobrenadante fue removido. A la pastilla de células resultante, se añadió 10 ml de medio MEM-α (fabricado por Invitrogen, Inc.) que contenía 5 ng/ml de M-CSF (fabricado por R&D Systems, Inc.) y 10% de suero de bovino fetal (FBS) para suspenderlo. Después, la suspensión resultante se hizo pasar a través de un colador de células (40 μm Nylon, fabricado por BD Falcon) para remover agregados. Las células resultantes fueron transferidas a un matraz en forma de T de 75 cm^2 (para la unión de células adherentes) y se cultivaron durante la noche en una incubadora con CO_2. Después del cultivo durante la noche, las células que no se adherieron al matraz en forma de T fueron recuperadas y usadas como células no adherentes de médula ósea de ratón.

EJEMPLO 9

Evaluación de actividad biológica de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata basado en prueba para formación de osteoclastos de ratón

Al usar todas las 10 muestras de prueba de los anticuerpos monoclonales anti-ratón Siglec-15 producidos en el ejemplo 6, un efecto sobre diferenciación de osteoclastos de células no adherentes de médula ósea de ratón se examinó. Las células no adherentes de médula ósea de ratón preparadas por el método del ejemplo 8 se preparó a 1.5 x 10^5 células/ml en medio α-MEM que contenía 10% de FBS y 10 ng/ml de M-CSF (fabricado por R&D System, Inc.), y la preparación de células resultante se sembró en cada pozo de una placa de 96 pozos en una cantidad de 200 μl y las células se cultivaron durante 2 días en una incubadora con CO_2. La solución de cultivo viejo en la placa de 96 pozos fue removida, y 100 μl de medio MEM-α se añadió a cada pozo, los 100 μl de medio MEM-α que contenía 10% FBS al cual se habían añadido RANKL humano (RANKL, fabricado por Peprotech, Inc.) y M-CSF para dar concentraciones finales de 20 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente. A la solución de cultivo de células, cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-ratón Siglec-15 de ratas producido en el ejemplo 6, una muestra obtenida al remover azida de sodio de IgG de control de rata comercialmente disponible (IgG de rata purificado, fabricado por R&D Systems, Inc.), o un anticuerpo policlonal anti-ratón Siglec-15 (No. 3) de conejo producido por separado se añadió a una concentración de 32 a 1,000 ng/ml, y las células se cultivaron durante 3 días adicionales en una incubadora de CO_2. Incidentalmente, el anticuerpo policlonal (No. 3) es un anticuerpo que ya se ha confirmado que inhibe la formación de osteoclastos en el sistema experimental descrito en este ejemplo. Después de completarse el cultivo, la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos formados se midió por un procedimiento descrito más adelante. La solución de cultivo en cada pozo

de la placa de 96 pozos fue removida por succión, y 50 µl de 50 mM citrato de sodio regulador de pH (pH 6.1) que contenía 1% de Triton X-100 se añadió a cada pozo. Después, la placa se agitó durante 5 minutos sobre un agitador de placa para lisar las células. A cada pozo, 50 µl de una solución de sustrato (50 mM citrato de sodio regulador de pH (pH 6.1) que contenía 5 mg/ml de p-nitrofenil fosfato y 0.46% de tartrato de sodio) se añadió, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, 50 µl de una solución de hidróxido de sodio 1 N se añadió a cada pozo de la placa de 96 pozos para detener la reacción enzimática. Después de detener la reacción enzimática, una absorbancia de cada pozo a 405 nm se midió, y la medición obtenida se usó como un índice de actividad de TRAP. Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6. Una inhibición significativa de actividad de TRAP no se observó en el caso de la IgG de control de rata comercialmente disponible. Por otra parte, una inhibición significativa de actividad de TRAP se observó en el caso del anticuerpo #32A1 añadido en el intervalo de 32 ng/ml a 1000 ng/ml, y el anticuerpo #8A1 y el anticuerpo policlonal No. 3 de conejo purificado en cuanto a afinidad añadido en el intervalo de 63 ng/ml a 1000 ng/ml. También en el caso del anticuerpo #3A1, anticuerpo #34A1 y anticuerpo #39A1, una inhibición de actividad de TRAP dependiente de la dosis se observó a una concentración relativamente alta de 500 ng/ml o superior. No se observó inhibición de formación de osteoclastos de ratón por lo otros anticuerpos. De los resultados anteriores, los anticuerpos que inhiben fuertemente la formación de osteoclastos de ratón (diferenciación y maduración de osteoclastos) se encontraron entre el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas preparado. Además, como una propiedad común al anticuerpo #3A1, anticuerpo #8A1, anticuerpo #32A1, anticuerpo #34A1, y anticuerpo #39A1, la actividad de inhibir la formación de osteoclastos a una concentración de 1000 ng/ml, es decir, 1 µg/ml o menor se puede ejemplificar.

EJEMPLO 10

Producción de constructo de expresión de proteína Siglec-15 humana soluble

Una secuencia parcial de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de proteína Siglec-15 humana está representada por SEQ ID NO: 15 en el listado de secuencias y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por SEQ ID NO: 16 en el listado de secuencias. Al utilizar dicha secuencia parcial, la proteína Siglec-15 humana soluble puede ser producida en un sobrenadante de cultivo de una célula animal o similar.

a) Amplificación de gen de Siglec-15 humano soluble por PCR

Como iniciadores para amplificar el ADNc extracelular del dominio de Siglec-15 humano por PCR, un oligonucleótido que tenía una secuencia de 5'-ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccATGGAA AAGTCCATCT GGCTGC-3' (hSiglec-15-ECD-F: SEQ ID NO: 17 en el listado de secuencias); y un oligonucleótido que tenía una secuencia de 5'-ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc CCCGCTGGCG CCATGGAAGC GG-3' (hSiglec-15-ECD-R: SEQ ID NO: 18 en el listado de secuencias) se sintetizaron de conformidad con un procedimiento común. Incidentalmente, estos iniciadores fueron diseñados, como iniciadores de amplificación para producir un clon de entrada de Gateway, de tal manera que una secuencia de attB1 se añade a hSiglec-15-ECD-F y una secuencia de attB2 se añade a hSiglec-15-ECD-R. La PCR se realizó usando esta combinación de iniciadores y un polinucleótido que contenía una secuencia de lectura abierta de la Siglec-15 humana como una plantilla de conformidad con un procedimiento común. La solución de reacción de PCR resultante fue purificada usando PureLink

PCR Purificación Kit (fabricado por Invitrogen, Inc.).

b) Producción de clon de entrada por reacción de Gateway BP

Un clon de entrada en el cual el ADNc extracelular del dominio de Siglec-15 humano fue integrado por la tecnología Gateway (Invitrogen, Inc.) utilizando un sistema de recombinación específico del sitio de fago lambda fue producido por el siguiente método. Primero, una reacción de BP usando BP Clonase se realizó entre el producto de PCR que tenía una secuencia de attB en ambos extremos producida en a) y pDNOR221 (fabricado por Invitrogen, Inc.) que es un vector donador que tenía una secuencia de attP. Al usar esta solución de reacción, *Escherichia coli* TOP10 fue transformada, se realizó PCR de colonia para clones resistentes a fármacos, y el tamaño de los insertos fue confirmado. Después, para un clon que se confirmó que tenía un inserto con el tamaño correcto, se realizó un análisis de secuencia de la secuencia de ADN total del inserto. Como resultado, se obtuvo un clon de entrada que es completamente idéntico a la secuencia objetivo de nucleótidos (SEQ ID NO: 15 en el listado de secuencias) que codifica el dominio extracelular de la proteína Siglec-15 humana.

c) Producción de clon de expresión por reacción de Gateway LR

Un clon de expresión en el cual el ADNc extracelular del dominio de Siglec-15 humano fue integrado por la tecnología Gateway (Invitrogen, Inc.) utilizando un sistema de recombinación específico del sitio de fago lambda fue producido por el siguiente método. El clon de entrada producido en b) contenía un inserto que tenía una secuencia de attL en ambos extremos. Una reacción de LR usando LR Clonase se realizó entre este clon de entrada y dos tipos de vectores de destino que tenían una secuencia de attR. Incidentalmente, como los vectores de destino, dos tipos de vectores de destino: pDONM diseñados de tal manera

que una etiqueta de epítope V5 y una His tag 6x se añaden al C terminal del inserto; y phIgFc diseñados de tal manera que una etiqueta Fc humana se añade al C terminal del inserto, se usaron. Al usar la solución de reacción obtenida por la reacción LR, *Escherichia coli* TOP10 fue transformada, y un análisis de secuencia se realizó para los clones resistentes a fármacos resultantes para confirmar si ocurrió recombinación correcta.

Como resultado del análisis de secuencia, se obtuvieron clones de expresión (Siglec-15/pDONM humano soluble y Siglec-15/phIgFc humano soluble) en el cual ocurrió recombinación correcta tanto para pDONM como para phIgFc, respectivamente. Al transfectar el Siglec-15/pDONM humano soluble en una célula animal o similar, ARNm que tenía una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 19 en el listado de secuencias es transcrita y traducida en una proteína (Siglec-15-His humana) que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20 en el listado de secuencias. Además, al transfectar el Siglec-15/phIgFc humano soluble en una célula animal o similar, ARNm que tiene una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 21 en el listado de secuencias es transcrita y traducida en una proteína (Siglec-15-Fc humana) que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 22 en el listado de secuencias.

EJEMPLO 11

Preparación a gran escala de solución de cultivo que contiene soluble proteína Siglec-15 humana usando células 293-F

a) Preparación de solución de cultivo que contiene Siglec-15-His humana

La Siglec-15/pDONM humana soluble obtenida en el ejemplo 10 se

preparó en una cantidad de aproximadamente 25 mg. Incidentalmente, en la purificación de plásmidos de *Escherichia coli* cultivada a gran escala, se usó un kit Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Gigaprep Kit (fabricado por Invitrogen, Inc.). El plásmido así preparado se mezcló con Opti-MEM (fabricado por Invitrogen, Inc.), 50 ml de reactivo de transfección 293fectin (fabricado por Invitrogen, Inc.) se añadió al mismo, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Esta mezcla se añadió a células FreeStyle 293-F (fabricado por Invitrogen, Inc.) cultivadas en medio de expresión FreeStyle 293 Expression Medium (fabricado por Invitrogen, Inc.) que contenía 1% de penicilina-estreptomicina de tal manera que la densidad de células alcanzó 1.0 a 3.4 x 10^6 células/ml usando un aparato de cultivo de bioproceso 25 L (WAVE Bioreactor). Después de que las células habían sido sometidas a cultivo con agitación (30 rotaciones/min) a una concentración de CO_2 de 6 a 12% durante 96 horas (4 días) a 37°C, la solución de cultivo se recolectó y se centrifugó para preparar un sobrenadante de cultivo. Se observa que en el sobrenadante de cultivo así preparado, una proteína en la cual una etiqueta de epítope V5 y una His tag 6x se han añadido al lado C-terminal del dominio extracelular Siglec-15 humano (Siglec-15-His humana) es expresada.

b) Preparación de solución de cultivo que contenía Siglec-15-Fc humana

La Siglec-15/phIgFc humana soluble obtenida en el ejemplo 10 se preparó en una cantidad de aproximadamente 5 mg. Incidentalmente, en la purificación de plásmidos de *Escherichia coli* cultivada a gran escala, se usó un kit Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Gigaprep Kit (fabricado por Invitrogen, Inc.). El plásmido así preparado se mezcló con Opti-MEM (fabricado por Invitrogen, Inc.), seguido por esterilización en filtro. Después, 10 ml de un reactivo de transfección

293fectin (fabricado por Invitrogen, Inc.) se añadió al mismo, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Esta mezcla se añadió a células FreeStyle 293-F (fabricado por Invitrogen, Inc.) cultivadas en matraces Erlenmeyer de tal manera que la densidad de células alcanzó 1.0 a 3.0 x 10^6 células/ml x 5 L (1 L/matraz x 5 matraces) en medio de expresión FreeStyle 293 (fabricado por Invitrogen, Inc.). Después de que las células habían sido sometidas a cultivo con agitación (125 rotaciones/min) a una concentración de CO_2 de 8.0% durante 96 horas (4 días) a 37°C, la solución de cultivo se recolectó y se centrifugó para preparar un sobrenadante de cultivo. Se observa que en el sobrenadante de cultivo así preparado, una proteína en la cual una etiqueta Fc humana se ha añadido al lado C-terminal del dominio extracelular Siglec-15 humano (Siglec-15-Fc humana) es expresada.

EJEMPLO 12

Purificación de proteína Siglec-15 humana soluble

a) Purificación de Siglec-15-His humana soluble

a-i) Cromatografía en columna HisTrap HP

A 12 L de la solución de cultivo de células 293F que expresan Siglec-15-His humana preparada en a) del ejemplo 11, 1350 mL de 10 x regulador de pH (500 mM Tris, 1.5 M NaCl, 200 mM imidazol, pH 8.0) se añadió, y la mezcla resultante se agitó bien y se filtró a través de un filtro MilliPak-60 (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Esta solución de cultivo se aplicó a una velocidad de flujo de 10 ml/min a una columna Ni-Sepharose HP (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) de 100 ml que previamente había sido lavada con agua pura (Milli-Q water). Después de que la columna había sido lavada con 400 ml de regulador de pH Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) que contiene 300 mM NaCl a una velocidad de flujo de 8

mL/min, una proteína adsorbida a la columna se eluyó con 200 ml de regulador de pH 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) que contenía 300 mM NaCl y 500 mM imidazol a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min, y el material eluido fue fraccionado en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.). Para prevenir la precipitación de la proteína, 8 ml de una solución NaCl 5 M se añadió a aproximadamente 40 ml de una fracción que contenía la proteína eluida, seguida por agitación, y después la mezcla resultante se concentró a aproximadamente 20 ml con un concentrador de membrana centrífuga Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.). El material insoluble generado durante la concentración fue removido por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C, y 2.5 ml del sobrenadante resultante se aplicó a una columna de desalación PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con solución salina regulada en su pH con fosfato que contenía 1 M NaCl (N-PBS), seguido por elución con N-PBS, por lo que 3.5 ml de una muestra cuyo solvente fue reemplazado por N-PBS se obtuvo. Este procedimiento se realizó repitiéndolo 7 veces más, y se obtuvo aproximadamente 28 ml de una solución de Siglec-15-His humana parcialmente purificada.

a-ii) Cromatografía en columna Resource Q

12 ml de la muestra que había sido purificada por cromatografía en columna Ni-Sepharose HP y cuyo solvente había sido reemplazado por N-PBS se dializó durante la noche a 4°C contra regulador de pH Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) que contenía 0.1% CHAPS (1 L, 3 veces) y el dializado resultante se centrifugó a 3,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, y el precipitado fue removido. Después de que el sobrenadante resultante se había filtrado a través de un filtro Millex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el filtrado se aplicó a una velocidad de flujo de 1 ml/min a una columna Resource Q 6 ml (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con regulador de pH Tris-HCl 50 mM

(pH 7.5) que contenía 0.1% CHAPS. Por lo tanto, la columna se lavó con este regulador de pH a una velocidad de flujo de 1 ml/min y una fracción de proteína que no fue adsorbida a la columna fue recolectada. Una proteína adsorbida a la columna se eluyó con regulador de pH Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) que contiene 0.1% CHAPS y NaCl 1 M a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Después de que 26.5 ml de la fracción que no había sido adsorbida a la columna se concentró a 3.0 ml con un concentrador de membrana centrífuga Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el concentrado se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el precipitado fue removido. 2.5 ml del sobrenadante resultante se aplicó a una columna de desalación PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con solución salina regulada en su pH con fosfato que contiene clorhidrato de arginina 50 mM (pH 7.0, A-PBS), seguido por elución con A-PBS, por lo que 3.5 ml de una muestra cuyo solvente fue reemplazado por A-PBS se obtuvo. El clorhidrato de arginina en el solvente de la muestra preparada se añadió a fin de prevenir Siglec-15-His humana soluble a partir de precipitación. El sobrenadante después de la centrifugación fue crioconservado a –80°C hasta usarse. El procedimiento de purificación antes mencionado (cromatografía en columna Resource Q) se realizó al repetirlo dos veces.

a-iii) Detección y prueba de pureza de Siglec-15-His humana purificada

Al usar una muestra preparada por el procedimiento de purificación antes mencionado (cromatografía en columna Ni-Sepharose HP y cromatografía en columna Resource Q), se realizó electroforesis de SDS-poliacrilamida bajo condiciones reductoras y tinción con plata. Es decir, a 5 μl de cada una de las muestras purificada por los pasos de purificación respectivos, una cantidad

equivalente de una solución de tratamiento de SDS se añadió, y la mezcla resultante se trató térmicamente a 95°C durante 10 minutos. 0.3 μl de cada una de las muestras térmicamente tratadas se usó para electroforesis de SDS-poliacrilamida. El procedimiento de electroforesis se realizó de la misma manera que en el ejemplo 3 excepto que Rainbow Molecular Weight Markers (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) se usaron como los marcadores de peso molecular. Después de completarse la electroforesis, se realizó tinción con plata usando un kit PhastGel Silver Kit (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y PhastSystem. Los resultados se muestran en la figura 7. Se mostró que una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 35 kDa (human Siglec-15-His) fue eficientemente purificada y concentrada en la fracción de proteína que no fue adsorbida a la columna Resource Q.

a-iv) Medición de concentración de proteína de Siglec-15-His humana purificada

Para la Siglec-15-His humana purificada (la fracción de proteína que no fue adsorbida a la columna Resource Q), la concentración de proteína se midió con un kit de prueba de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) usando albúmina de suero de bovino como una muestra estándar. Al realizar el procedimiento de purificación dos veces, se obtuvo un total de 1.66 mg de Siglec-15-His humana purificada.

b) Purificación de Siglec-15-Fc humana soluble

b-i) Proteína en columna HiTrap Protein A

1.5 L de la solución de cultivo de células 293F que expresan Siglec-15-Fc humana preparada en b) del ejemplo 11 se filtró a través de un filtro Sterivex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.), y después el filtrado se aplicó a una

velocidad de flujo de 5 ml/min a una columna HiTrap Protein A 5 ml (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con PBS de Dulbecco (D-PBS, fabricado por Invitrogen, Inc.). Después de que la columna había sido lavada con 70 ml de D-PBS a una velocidad de flujo de 5 ml/min, una proteína adsorbida a la columna se eluyó con 24 ml de 0.1 M citrato de sodio regulador de pH (pH 3.0) a una velocidad de flujo de 1.2 ml/min. El material eluido se fraccionó a 1.2 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, 0.31 ml de 1 M Tris se añadió al mismo para neutralizar el material eluido. Una alícuota de 2.5 ml de una solución (aproximadamente 7.5 ml) obtenida al combinar las fracciones de proteína eluida (fracciones 5 a 9) se aplicó a una columna de desalación PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con solución salina regulada en su pH con fosfato que contenía clorhidrato de arginina 50 mM (pH 7.0, A-PBS), seguido por elución con A-PBS, por lo que se obtuvo 3.5 ml de una muestra cuyo solvente fue reemplazado por A-PBS. Este procedimiento se realizó al repetirlo dos veces. El clorhidrato de arginina en el solvente se añadió para evitar que Siglec-15-Fc humana soluble se precipitara. 2.5 ml de la solución restante de las fracciones de proteína eluidas (fracciones 5 a 9) se aplicó a una columna de desalación PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que previamente había sido equilibrada con solución salina regulada en su pH con fosfato que contenía NaCl 1 M (pH 6.7, N-PBS), seguido por elución con N-PBS, por lo que se obtuvo 3.5 ml de una muestra cuyo solvente fue reemplazado por N-PBS. NaCl en el solvente en la muestra preparada se añadió para evitar que Siglec-15-Fc humana soluble se precipitara sin añadir un grupo amino que contenía compuestos tales como arginina. Las muestras preparadas por el procedimiento antes mencionado fueron crioconservadas a –80°C hasta usarse.

b-ii) Detección y prueba de pureza de Siglec-15-Fc humana purificada

Al usar las muestras preparadas por el procedimiento de purificación antes mencionado, se realizaron electroforesis de SDS-poliacrilamida bajo condiciones reductoras y tinción con plata. Es decir, a 5 μl de cada una de las muestras purificada por los pasos de purificación respectivos, una cantidad equivalente de una solución de tratamiento de SDS se añadió, y la mezcla resultante se calentó a 95°C durante 10 minutos. 0.3 μl de una muestra obtenida al diluir cada una e las muestras térmicamente tratadas a 1/100 ó 1/300 con una mitad de la concentración de la solución de tratamiento con SDS se usó para electroforesis de SDS-poliacrilamida. La electroforesis y tinción con plata se realizaron de la misma manera que la prueba de pureza de Siglec-15-His human descrita en a-iii). Los resultados se muestran en la figura 8. Se mostró que una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 55 kDa (Siglec-15-Fc humana) fue eficientemente purificada y concentrada en la fracción de proteína que se eluyó de la columna de HiTrap Protein A.

b-iii) Medición de concentración de proteína de Siglec-15-Fc purificada humana

Para la Siglec-15-Fc humana purificada (la fracción de proteína eluida de la columna de desalación de PD-10), la concentración de proteína se midió con un kit de prueba de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) usando albúmina de suero de bovino como una muestra estándar. Como se muestra en el cuadro 4, un total de 25.2 mg de Siglec-15-Fc purificada humana se obtuvo al realizar el procedimiento de purificación dos veces.

CUADRO 4

	Concentración de proteína (mg/ml)	Volumen de la muestra. (ml)	Total de proteína (mg)
Solvente que contiene Arg	2.3	7.0	16.1
Solvente que contiene NaCl	2.6	3.5	9.1
Total			25.2

EJEMPLO 13

Evaluación de propiedad de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata que se une a proteína Siglec-15 humana

La propiedad del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata que se une a proteína Siglec-15 humana se evaluó por un método de ELISA. La proteína Siglec-15-Fc humana (sometida a reemplazo con A-PBS) producida en b) del ejemplo 12 se diluyó a 5 μg/ml con un regulador de pH de carbonato de sodio 0.1 M (pH 9.5), y la solución resultante se añadió a una placa de 96 pozos (fabricado por Nalge Nunc International, Inc., Cat. No. 430341) a 100 μl/pozo. Después de que la placa se había dejado a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución fue removida y un regulador de pH de lavado (solución salina regulada en su pH con fosfato que contenía 0.05% de Tween 20) se añadió a 300 μl/pozo y después se removió. Después de que este procedimiento de lavado se había realizado una vez más, la solución salina regulada en su pH con fosfato que contenía 25% de BlockAce (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) se añadió a 200 μl/pozo, y la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, por lo que se realizó el bloqueo. El líquido fue removido, y la placa se lavó dos veces con 300 μl/pozo del regulador de pH de lavado. Después, cada uno del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas preparado en el ejemplo 6 o

IgG de control de rata (fabricado por R&D Systems, Inc.) se diluyó a una concentración final de 1.28 a 20,000 ng/ml (series de dilución de 5 veces) con un regulador de pH de ELISA (solución salina regulada en su pH con fosfato que contenía 12.5% de BlockAce y 0.05% de Tween 20), y la solución de anticuerpo diluida se añadió a la placa a 100 μl/pozo. Después de que la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, el líquido fue removido, y la placa se lavó 3 veces con 300 μl/pozo del regulador de pH de lavado. Subsecuentemente, un anticuerpo de IgG anti-rata de cabra carcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) (fabricado por Beckman Coulter, Inc.) diluido a 1,000 veces con un regulador de pH de ELISA se añadió a 100 μl/pozo, y la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. El líquido fue removido y la placa se lavó 3 veces con 300 μl/pozo del regulador de pH de lavado, y después, usando un kit de revelado de color para peroxidasa (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), el color fue revelado de conformidad con el protocolo que acompañaba al kit. Después de revelar el color, una absorbancia a 492 nm se midió usando un lector de microplaca (fabricado por Nihon Molecular Devices Corporation). Como resultado, se confirmó que todas las 10 muestras de prueba examinadas del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas se unen a la proteína Siglec-15 humana de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo (figura 9). En particular, la actividad de unión de 5 muestras de prueba, a saber #1A1, #3A1, #24A1, #32A1 y #61A1, fue alta, y la actividad de unión de 3 muestras de prueba, a saber #8A1, #34A1 y #39A1, fue relativamente baja. Por otra parte, en el caso de la IgG de control de rata, no se observó la unión a la proteína Siglec-15 humana. De los resultados anteriores, se mostró que el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas preparado en el ejemplo 6 se une no sólo a Siglec-15 de ratón, sino también a Siglec-15 humana, y además, se encontró que algunos anticuerpos se unen fuertemente a Siglec-15 humana.

EJEMPLO 14

Efecto de la adición de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata sobre la fusión celular y actividad de resorción de hueso de células precursoras de osteoclastos humanos normales (evaluación de actividad biológica *in vitro*)

Puesto que se confirmó que el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas se une también a Siglec-15 humana en el ejemplo 13, los efectos de estos anticuerpos sobre la formación de osteoclastos humanos y la actividad de resorción de hueso se examinaron.

a) Efecto de la adición de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata sobre la fusión celular de los osteoclastos a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales (tinción TRAP)

Células precursoras de osteoclastos humanos normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) se sembraron en una placa de 96 pozos a 1 x 10^4 células/pozo de conformidad con el protocolo que acompaña las células. Como el medio, se usó un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) complementadas con un conjunto de complemento de OPGM (comprado de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) que contenía suero de bovino fetal (concentración final: 10%), RANKL humana (concentración final: 66 ng/ml), M-CSF humana (concentración final: 33 ng/ml), y similares. Al sobrenadante de cultivo resultante, cada uno del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas preparado en el ejemplo 6 o IgG de control de rata (fabricado por R&D Systems, Inc.) se añadió para dar una concentración final de 30 μg/ml, y las células se

cultivaron durante 4 días en una incubadora de CO_2. Después del cultivo, el sobrenadante fue removido, y 10% de formalina neutra se añadió para fijar las células. Después de fijar las células, las células se lavaron dos veces con agua destilada, una solución de tinción de TRAP (0.27 mM naftol AS-MX fosfato (fabricado por Sigma Co., Ltd.), 1.6 mM sal de violeta rojo resistente (fabricado por Sigma Co., Ltd.), 1% de dimetilformamida, 50 mM tartrato de sodio, 0.1 M regulador de pH de acetato de sodio (pH 5.0)) se añadió a 100 μl/pozo, y una reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la reacción, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y después se observaron por microscopia (figura 10). Como resultado, la formación de osteoclastos gigantes que resultan de un alto grado de fusión celular fue casi completamente inhibido mediante la adición del anticuerpo #32A1. Además, en el caso del anticuerpo #41A1, la formación de osteoclastos gigantes que resultan de un alto grado de fusión celular también fue significativamente inhibida. Por otra parte, en el caso de los otros anticuerpos monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas (el anticuerpo #1A1 y otros) y la IgG de control de rata, no se observó la inhibición significativa de osteoclasto de fusión celular. De esta manera, se reveló que la multinucleación y fusión celular de osteoclastos TRAP-positivos a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales son inhibidas por anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la proteína Siglec-15.

b) Efecto de la adición de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (#32A1) sobre la fusión celular de osteoclastos a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales (tinción TRAP)

Células precursoras de osteoclastos humanos normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) se sembraron en una placa de 96 pozos a 1 x 10^4

células/pozo de conformidad con el protocolo que acompaña las células. Como el medio, se usó un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) complementadas con un conjunto de complemento de OPGM (comprado de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) que contenía suero de bovino fetal (concentración final: 10%), RANKL humana (concentración final: 68.4 ng/ml), M-CSF humana (concentración final: 33 ng/ml), y similares. Al sobrenadante de cultivo resultante, el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) preparado en el ejemplo 6 se añadió para dar una concentración final de 0.1, 0.3, 1 ó 3 μg/ml, y las células se cultivaron durante 3 días en una incubadora de CO_2. Después del cultivo, el sobrenadante fue removido, y 10% de formalina neutra se añadió para fijar las células. Después de fijar las células, las células se lavaron dos veces con agua destilada, una solución de tinción de TRAP (0.27 mM naftol AS-MX fosfato (fabricado por Sigma Co., Ltd.), 1.6 mM sal de violeta rojo resistente LB (fabricado por Sigma Co., Ltd.), 1% de dimetilformamida, 50 mM tartrato de sodio, 0.1 M regulador de pH de acetato de sodio (pH 5.0)) se añadió a 100 μl/pozo, y una reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la reacción, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y después se observaron por microscopia (figura 11). Como resultado, la formación de osteoclastos multinucleados TRAP-positivos fue inhibida de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo #32A1 dentro del intervalo de 0.3 μg/ml a 3 μg/ml.

c) Efecto de la adición de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (#32A1) sobre la actividad de resorción de hueso de células precursoras de osteoclastos humanos normales (Evaluación usando placa revestida con colágeno)

Se sabe que los osteoclastos liberan una proteasa tal como catepsina K y degradan colágeno de tipo I que es un componente constitucional de tejido óseo. El OsteoLyse Assay Kit (fabricado por Lonza, Inc., Cat. No. PA-1500) provee una placa de 96 pozos revestida con colágeno humano conjugado con europio (placa de cultivo de células de 96 pozos OsteoLyse), y es posible evaluar la actividad de resorción de hueso de osteoclastos *in vitro* al medir la cantidad de fragmentos de colágeno fluorescente liberados en el sobrenadante cuando los osteoclastos son cultivados en la placa. Células precursoras de osteoclastos humanos normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) se sembraron en una placa de cultivo de células de 96 pozos OsteoLyse a 1 x 10^4 células/pozo de conformidad con de conformidad con el protocolo que acompaña las células. Como el medio, se usó un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) complementadas con un conjunto de complemento de OPGM (comprado de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) que contenía suero de bovino fetal (concentración final: 10%), RANKL humana (concentración final: 68.4 ng/ml), M-CSF humana (concentración final: 33 ng/ml), y similares. Al sobrenadante de cultivo resultante, el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) preparado en el ejemplo 6 se añadió para dar una concentración final de 0.1, 0.3, 1 ó 3 μg/ml, y las células se cultivaron durante 3 días en una incubadora de CO_2. Una alícuota de 10 μl del sobrenadante de cultivo fue recolectada, y 200 μl de reactivo de liberación de fluoróforo incluido en el OsteoLyse Assay Kit se añadió al mismo, y una intensidad de fluorescencia se midió (Excitación: 340 nm, Emisión: 615 nm) usando un lector de placa de fluorescencia (ARVO MX, fabricado por Perkin Elmer Inc.), por lo que la cantidad de fragmentos de colágeno fluorescente libres liberados en el sobrenadante de cultivo se determinó (figura

12). Como resultado, la cantidad de fragmentos de colágeno fluorescente incrementada mediante la adición de RANKL fue reducida por el anticuerpo #32A1 de una manera dependiente de la concentración dentro del intervalo de 0.3 μg/ml a 3 μg/ml. A partir de este resultado, se reveló que la actividad de resorción de hueso de osteoclastos humanos es inhibida por el anticuerpo monoclonal estudiado que se une específicamente a la proteína Siglec-15.

EJEMPLO 15

Evaluación de actividad biológica de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata usando ratas ovariectomizadas

a) Protocolo de experimento con animales

Los ovarios en ambos lados fueron removidos de ratas F344 hembras (obtenidas de Charles River Laboratories Japan, Inc.) de 12 semanas de edad, y las ratas se dividieron en tres grupos: un grupo de administración de vehículo; un grupo de administración de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #8A1; y un grupo de administración de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1. Además, un grupo se preparó como un grupo de operación simulador. En los grupos de administración de anticuerpo, el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #8A1 o el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 preparado en el ejemplo 6 se administró intraperitonealmente a una dosis de 1 mg/kg tres veces a la semana repetidamente durante 4 semanas desde el día siguiente de la operación. En el grupo de administración de vehículo y el grupo de operación simulador, PBS que contenía 0.01% de Tween 20 se administró intraperitonealmente como el vehículo. A 4 semanas después del inicio de la administración, la orina fue recolectada durante 24 horas bajo condiciones de ayunas, y las muestras de orina se

almacenaron a -80°C hasta medición. Después de completarse la recolección de orina, las ratas fueron sacrificadas, y la espina lumbar se extirpó de cada rata

b) Medición de densidad de minerales de hueso de espina lumbar

Los tejidos blandos adheridos a la espina lumbar extirpada se removieron, y la 4ª. a 6ª. vertebras lumbares fueron extraídas. Las vertebras lumbares extraídas fueron desgrasadas y deshidratadas al ser agitadas en etanol y después secadas con aire, y la densidad de minerales de hueso se midió usando un densitómetro de hueso (DCS-600EX, fabricado por Aloka Co., Ltd.). Los resultados se muestran en la figura 13(A). Una disminución significativa en densidad de minerales de hueso de la espina lumbar se observó en el grupo ovariectomizado como se comparó con el grupo de operación simulador, sin embargo, en los grupos de administración de anticuerpo #8A1 y #32A1, una disminución en densidad de minerales de hueso debida a ovariectomía fue significativamente inhibida.

c) Medición excreción de desoxipiridinolina

Una variedad de metabolitos entrelazados de colágeno de tipo I refleja agudamente el recambio metabólico de hueso, particularmente resorción de hueso. Por sobre todo, la desoxipiridinolina está localizada principalmente en colágeno de hueso, y por lo tanto, se considera que es altamente confiable como un índice de resorción de hueso.

La muestra de orina crioconservada fue descongelada, y el material insoluble se precipitó por una operación centrífuga, por lo que se obtuvo un sobrenadante. La cantidad de desoxipiridinolina contenida en este sobrenadante se midió usando Osteolinks "DPD" (fabricado por DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Además, usando Creatinine Test Wako (fabricado por Wako Pure Chemical

Industries, Ltd.), el contenido de creatinina en el sobrenadante también se midió, y se calculó la cantidad de desoxipiridinolina corregida para creatinina. Los resultados se muestran en la figura 13(B). La excreción de desoxipiridinolina urinaria fue significativamente increentada en el grupo ovariectomizado en comparación con el grupo simulador, y por lo tanto, se indicó que en las ratas ovariectomizadas, la resorción osteoclástica de hueso es incrementada. Por otra parte, en los grupos de administración de anticuerpo #8A1 y #32A1, un incremento en excreción de desoxipiridinolina debido a ovariectomía fue inhibido de tal manera que el nivel de excreción de desoxipiridinolina fue comparable con el del grupo de operación de simulación. A partir de este resultado, también se confirmó en los modelos animales que los anticuerpos monoclonales estudiados que se unen específicamente a Siglec-15 inhiben la resorción osteoclástica de hueso, y se indicó fuertemente que debido al efecto inhibidor sobre la resorción de hueso, una disminución en densidad de minerales en hueso de la espina lumbar en las ratas ovariectomizadas fue inhibida.

EJEMPLO 16

Determinación del sitio de unión (epítope) de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata

a) Expresión y purificación de dominio Siglec-15 V-set humano

Un ADN que codifica una proteína en la cual una His tag y una secuencia de reconocimiento de trombina se fijaron al lado N-terminal de un dominio Siglec-15 V-set humano (un polipétido que comprende 39 a 165 residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos en la base de datos NCBI Protein con el número de acceso de NP_998767 o una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias) fue integrada en un

vector pDEST14 (Invitrogen, Inc., Cat. No. 11801-016). Al usar este plásmido, *Escherichia coli* Rosetta-gamiB (DE3) (Novagen, Inc., Cat. No. 71136-4) fue transformada y cultivada en un medio TB (Invitrogen, Inc., Cat. No. 22711-022). Después del cultivo, las células bacterianas fueron homogeneizadas por ultrasonido, el homogenado resultante fue centrifugado, y el sobrenadante fue purificado con una columna HisTrap HP (GE Healthcare, Co., Ltd., Cat. No. 17-5247-01). Por lo tanto, la His tag fue digerida con trombina, y después el dominio Siglec-15 V-set humano fue purificado usando una columna Mono S5/50 GL (GE Healthcare, Co., Ltd., Cat. No. 17-5168-01) y una columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare, Co., Ltd., Cat. No. 17-5174-01) hasta que una banda sencilla con un peso molecular de 14 kDa se obtuvo por electroforesis.

b) Purificación de Siglec-15-Fc humana soluble

La Siglec-15-Fc humana soluble fue purificada por el método descrito en el ejemplo 12.

c) ELISA competitiva de dominio V-set humano y anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1

En una placa maxi-sorp de 96 pozos (fabricada por Nunc, Inc., número de modelo: 442404), 100 μl de un anticuerpo FC anti-human de cabra (Jackson ImmunoResearch, Inc., número de modelo: 109-005-098) (1.25 μg/ml) se añadió a cada pozo y fue inmovilizado durante la noche a 4°C. Después de que la placa maxi-sorp de 96 pozos se lavó dos veces con PBS, 100 μl de la Siglec-15-Fc humana soluble (1 μg/ml) se añadió a cada pozo e inmovilizada a temperatura ambiente durante 1 hora. Por lo tanto, 300 μl de una solución al 5% de leche descremada/PBS se añadió a cada pozo, y el bloqueo de los pozos se realizó a temperatura ambiente durante 3 horas. Mientras tanto, 2 μg/ml del anticuerpo

monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 se mezcló con una cantidad equivalente de 0, 0.032, 0.16, 0.8, 4 ó 20 μg/ml del dominio Siglec-15 V-set humano, y una reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 1.5 horas. Después de que la placa maxi-sorp de 96 pozos había sido lavada dos veces con PBS, 100 μl de la solución mixta de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 y el dominio Siglec-15 V-set humano se añadió al mismo, y una reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que la placa maxi-sorp de 96 pozos se había lavado 5 veces con una solución de 0.05% de Tween 20 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Cat. No. 170-6531)/PBS (de aquí en adelante referida como "solución de PBST"), 100 μl de un anticuerpo anti-rata IgG de cabra marcado con HRP (Beckman Coulter, Inc., Cat. No. 732664, diluidas a 2000 veces) se añadió a las mismas, y una reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que la placa había sido lavada 5 veces con la solución, de PBST 100 μl de un líquido de revelado de color de ELISA POD Substrate ABTS Kit (Nacalai Tesque Co., Ltd., Cat. No. 14351-80) se añadió a la misma, y una reacción se dejó proceder durante 30 minutos. Después, 100 μl de una solución de detención de reacción se añadió a la misma, y una absorbancia a 405 nm se midió. Los resultados de ELISA competitiva mostró que la unión del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 a la Siglec-15 humana inmovilizada es inhibida en un dominio V-set humano de una manera dependiente de la concentración. Por consiguiente, se mostró que el epítope para el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 es el dominio Siglec-15 V-set humano (un dominio que comprende 39 a 165 residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos en la base de datos NCBI Protein con el número de acceso de NP_998767 o una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias) (figura 14).

EJEMPLO 17

Amplificación de ADNc que codifica la región variable de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 y análisis de secuencia de bases de la misma

a) Preparación de ARNm

El hibridoma #32A1 fue cultivada de conformidad con a) del ejemplo 6. De 4 x 10^7 células del hibridoma #32A1, aproximadamente 65 μg de ARNm se preparó usando un kit de purificación de ARNm QuickPrep (GE Healthcare, Co., Ltd.).

b) Síntesis de ADNc (5'-RACE-Ready cDNA)

La síntesis de ADNc (5'-RACE-Ready cDNA) se realizó usando 0.3 μg del ARNm preparado en a) con PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa Bio, Inc.) y SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Co., Ltd.).

c) Amplificación de ADNc de región variable de cadena pesada de gen #32A1 por 5'-RACE PCR

Como iniciadores para amplificar el ADNc de la región variable del gen de cadena pesada #32A1 por PCR, se usaron UPM (Universal Primer A Mix, unido al SMART RACE cDNA Amplification Kit) y un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-GGCCGGGTGGGCTACGTTGCAGGTGACGGTCTG-3' (RG2AR2: SEQ ID NO: 23 en el listado de secuencias). Como el UPM, se usó uno unido al SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Co., Ltd.), y el RG2AR2 se diseñó a partir de la secuencia de la región constante de cadena pesada de rata (IgG2a) en la base de datos y sintetizados de conformidad con un procedimiento común.

El ADNc de la región variable del gen de cadena pesada #32A1 fue amplificado por 5'-RACE PCR usando esta combinación de iniciadores y el ADNc sintetizado en b) (5'-RACE-Ready cDNA) como una plantilla. La PCR se realizó usando Advantage 2 PCR Kit (Clontech Co., Ltd.), y las condiciones para un ciclador térmico se establecieron como sigue: después de calentar un 94°C durante 1 minuto, un ciclo de temperatura de "94°C durante 0.5 minutos y 72°C durante 3 minutos" se repitió 5 veces, entonces un ciclo de temperatura de "94°C durante 0.5 minutos, 70°C durante 0.5 minutos, y 72°C durante 3 minutos" se repitió 5 veces, y posteriormente, un ciclo de temperatura de "94°C durante 0.5 minutos, 68°C durante 0.5 minutos, y 72°C durante 3 minutos" se repitió 20 veces, seguido por incubación a 4°C.

d) Amplificación de ADNc de región variable de gen de cadena ligera #32A1 por 5'-RACE PCR

Como iniciadores para amplificar el ADNc de la región variable de gen de cadena ligera #32A1 por PCR, se usaron UPM (Universal Primer A Mix, unido al SMART RACE cDNA Amplification Kit) y un oligonucleótido que tienen una secuencia de 5'-CATGCTGTACGTGCTGTCTTTGCTGTCCTGATCAG-3'(RKR2: SEQ ID NO: 24 en el listado de secuencias). Como el UPM, se usó uno unido al SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Co., Ltd.), y el RKR2 se diseñó a partir de la secuencia de la región constante de cadena ligera de rata (cadena κ) en la base de datos y sintetizada de conformidad con un procedimiento común.

El ADNc de la región variable de gen de cadena ligera #32A1 fue amplificado por 5'-RACE PCR usando esta combinación de iniciadores y el ADNc sintetizado en b) (5'-RACE-Ready cDNA) como una plantilla. La PCR se realizó usando Advantage 2 PCR Kit (Clontech Co., Ltd.), y las condiciones para un

ciclador térmico se establecieron como sigue: después de calentar a 94°C durante 1 minuto, un ciclo de temperatura de "94°C durante 0.5 minutos y 72°C durante 3 minutos" se repitió 5 veces, después, un ciclo de temperatura de "94°C durante 0.5 minutos, 70°C durante 0.5 minutos, y 72°C durante 3 minutos" se repitió 5 veces, y posteriormente, un ciclo de temperatura de "94°C durante 0.5 minutos, 68°C durante 0.5 minutos, y 72°C durante 3 minutos" se repitió 20 veces, seguido para incubación a 4°C.

e) Determinación de secuencias de ADNcs de base de cadena regiones variables pesada y ligera

El ADNc de la región variable de cadena pesada amplificada en c) fue purificado usando el MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN Inc.), y después se realizó el análisis de secuencia de la secuencia de ADN. Como un iniciador de secuenciación, un ologinucleótido que tiene una secuencia de 5'-CTCCAGAGTTCCAGGTCACGGTGACTGGC-3' (RG2AR3: SEQ ID NO: 25 en el listado de secuencias) se diseñó a partir de la secuencia de la región constante de cadena pesada de rata (IgG2a) en la base de datos y se sintetizó de conformidad con un procedimiento común.

El ADNc de la región variable de cadena ligera amplificada en d) fue purificada usando el MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN Inc.), y después el análisis de secuencia de la ADN secuencia se realizó. Como un iniciador de secuenciación, un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-TCCAGTTGCTAACTGTTCCG-3' (sqRK: SEQ ID NO: 26 en el listado de secuencias) se diseñó a partir de la secuencia de la región constante de cadena ligera de rata (cadena κ) en la base de datos y se sintetizó de conformidad con un procedimiento común.

El ADNc que contiene la región variable de cadena pesada obtenida por el análisis de secuencia tiene una base secuencia representada por SEQ ID

NO: 27 en el listado de secuencias y codifica la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias. La secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 1 a 19 de SEQ ID NO: 28 corresponde a una señal secretora, la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 20 a 140 de la misma corresponde a una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 141 a 167 de la misma corresponde a una región constante de cadena pesada (parcial). La región variable de cadena pesada antes mencionada contiene CDRH1 (DYFMN) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 44, CDRH2 (QIRNKIYTYATFYAESLEG) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 45, y CDRH3 (SLTGGDYFDY) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46. Además, el ADNc que contiene la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 29 en el listado de secuencias y codifica la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias. La secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 1 a 20 de SEQ ID NO: 30 corresponde a una señal secretora, la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 21 a 132 de la misma corresponde a una región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 133 a 139 de la misma corresponde a una región constante de cadena ligera (parcial). La región variable de cadena ligera antes mencionada contiene CDRL1 (RASQSVTISGYSFIH) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 47, CDRL2 (RASNLAS) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48, y CDRL3 (QQSRKSPWT) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 49.

EJEMPLO 18

Producción de constructo de expresión de gen de anticuerpo quimérico humano de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1

a) Producción de vectores de expresión universales pEF1/FCCU-1 y pEF6KCL

a)-i) Construcción de vector de expresión de cadena ligera humana pEF6KCL

Al realizar PCR usando un plásmido pEF6/V5-HisB (Invitrogen) como una plantilla y también usando los siguientes iniciadores, se obtuvo un fragmento de ADN desde el extremo 3' inmediatamente de BGHpA (2174) a SmaI (2958) (un fragmento de ADN que contiene origen de replicación f1 y promotor SV40 y origen, de aquí en adelante referido como "fragmento A").

5'-CCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC-3' (iniciador EFF1: SEQ ID NO: 31 en el listado de secuencias)

5'-AAACCCGGGAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGG-3' (iniciador EFsmaR: SEQ ID NO: 32)

El fragmento A obtenido y un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 33, de aquí en adelante referido como "fragmento B") que contiene una secuencia de ADN que codifica una señal secretora de cadena κ humana, una región constante de cadena κ humana, y una señal adicional poli-A humana fueron ligadas por PCR de traslape. El fragmento de ADN así obtenido en el cual el fragmento A y el fragmento B se ligaron (de aquí en adelante referido como "fragmento A+B") fue digerido con las enzimas de restricción KpnI y SmaI, que se ligó a un plásmido pEF6/V5-HisB (Invitrogen) que fue digerido con las enzimas de restricción KpnI y SmaI, por lo que un vector de expresión de cadena ligera humana pEF6KCL que

tenía una secuencia de señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena κ humana, y una secuencia de señal adicional poli-A humana hacia el extremo 3' del promotor EF1 se construyó.

a)-ii) Construcción de pEF1/KCL

Un fragmento de ADN obtenido al digerir el pEF6KCL obtenido por el método antes mencionado con las enzimas de restricción KpnI y SmaI se ligó a pEF1/myc-HisB (Invitrogen, Inc.) que fue digerido con KpnI y SmaI, por lo que se construyó un plásmido pEF1/KCL.

a)-iii) Construcción de vector de expresión de cadena pesada humana pEF1/FCCU-1

Un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 34 en el listado de secuencias) que contiene una secuencia de ADN que codifica una secuencia de señal de IgG1 humana y una región constante secuencia de aminoácidos fue digerida con las enzimas de restricción NheI y PmeI y fue ligada al plásmido pEF1/KCL que fue digerido con NheI y PmeI, por lo que un vector de expresión de cadena pesada humana pEF1/FCCU-1 que tenía una secuencia de señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena pesada humana, y una secuencia de señal adicional poli-A humana hacia el extremo 3' del promotor EF1 se construyó.

b) Producción de #32A1 cadena pesada de constructo de expresión de anticuerpo quimérico humano

Como iniciadores para amplificar el ADNc de la región variable de cadena pesada #32A1 por PCR, un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-aaagctgagcGAGGTGCAAATTTTGGAGACTGGAGGAGGC-3' (32A1HF: SEQ ID NO: 35 en el listado de secuencias) y un oligonucleótido que tiene una

secuencia de 5'-aaagctgagctGACTGTGACCATGACTCCTTGGCCCCAG-3' (32A1HR: SEQ ID NO: 36 en el listado de secuencias) se sintetizaron de conformidad con un procedimiento común.

Incidentalmente, para integrar un producto de PCR en pEF1/FCCU-1, estos iniciadores fueron diseñados de tal manera que una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción BlpI se añadió. El PCR se realizó de conformidad con un procedimiento común usando esta combinación de iniciadores y el ADNc de la región variable de cadena pesada purificado en e) del ejemplo 17 como una plantilla. El producto de PCR resultante fue purificado usando el MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Inc.), y después un fragmento de ADN obtenido al digerir el producto de PCR con la enzima de restricción BlpI (NEW ENGLAND BIOLABS, Inc.) se insertó en el pEF1/FCCU-1 en el sitio digerido con la enzima de restricción BlpI, por lo que una cadena pesada de constructo de expresión de anticuerpo quimérico humano #32A1 se construyó. La secuencia del inserto fue confirmada por un análisis de secuencia. Como un iniciador para secuenciación, un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (F11: SEQ ID NO: 37 en el listado de secuencias) fue sintetizado de conformidad con un procedimiento común. Un vector de expresión en el cual el inserto podría ser insertado correctamente se denominó "32A1H/pEF1/FCCU".

c) Producción de cadena ligera de constructo de expresión de anticuerpo quimérico humano #32A1

Como iniciadores para amplificar el ADNc de la región variable de cadena ligera #32A1 por PCR, un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-aaacatatggcGACATTGTCTTGACCCAGTCTCCTGCTTTGG-3' (32A1LF: SEQ ID NO: 38 en el listado de secuencias) y un oligonucleótido que tiene una secuencia

de 5'-aaacgtacgTCTCAATTCCAGCTTGGTGCCTCCAGCG-3' (32A1LR SEQ ID NO: 39 en el listado de secuencias) se sintetizaron de conformidad con un procedimiento común.

Incidentalmente, para integrar un producto de PCR a pEF6KCL, estos iniciadores fueron diseñados de tal manera que una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción NdeI se añadió a 32A1LF, y una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción BsiWI se añadió a 32A1LR. La PCR se realizó de conformidad con un procedimiento común usando esta combinación de iniciadores y el ADNc de la región variable de cadena ligera purificado en e) del ejemplo 17 como una plantilla. El producto de PCR resultante fue purificado usando el MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Inc.), y después, un fragmento de ADN obtenido al digerir el producto de PCR con las enzimas de restricción NdeI (TaKaRa Bio, Inc.) y BsiWI (NEW ENGLAND BIOLABS, Inc.) se insertó en el pEF6KCL en el sitio digerido con las enzimas de restricción NdeI (TaKaRa Bio, Inc.) y BsiWI (NEW ENGLAND BIOLABS, Inc.), por lo que una cadena ligera de constructo de expresión de anticuerpo quimérico humano #32A1 se construyó. La secuencia del inserto fue confirmada por un análisis de secuencia. Como un iniciador para secuenciación, se usó un iniciador F11 representado por SEQ ID NO: 37 en el listado de secuencias. Un vector de expresión en el cual el inserto podría ser insertado correctamente se denominó "32A1L/pEF6KCL".

El gen de cadena pesada de anticuerpo quimérico humano #32A1 producido en b) tiene la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 40 en el listado de secuencias y codifica la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 41 en el listado de secuencias. La secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 1 a 19 de SEQ ID NO: 41 corresponde a una señal secretora, la secuencia de aminoácidos representada por

los aminoácidos números 20 a 140 de la misma corresponde a una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 141 a 470 de la misma corresponde a una región constante de cadena pesada. Además, el gen de cadena ligera de anticuerpo quimérico humano #32A1 producido en c) tiene la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 42 en el listado de secuencias y codifica la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 43 en el listado de secuencias. La secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 1 a 20 de SEQ ID NO: 43 corresponde a una señal secretora, la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 21 a 132 de la misma corresponde a una región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos números 133 a 237 de la misma corresponde a una región constante de cadena ligera.

EJEMPLO 19

Preparación de anticuerpo quimérico humano de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1

a) Producción de anticuerpo quimérico humano

3 x 10^7 células de células 293 FreeStyle en fase de crecimiento logarítmica se sembró en 30 ml de medio de expresión FreeStyle 293 fresco (Invitrogen, Inc.) (se prepararon cuatro lotes, en el cual el cultivo de 30 ml se tomó como un lote) y se sometió a cultivo en agitación (125 rpm) a 37°C en una incubadora con 8% de CO_2. 300 μg de polietilenimina (fabricada por Polyscience, Inc. #24765) se disolvió en 1 ml de medio Opti-Pro SFM (fabricado por Invitrogen, Inc.), y la solución resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. El vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo quimérico humano #32A1,

32A1H/pEF1/FCCU y el vector de expresión cadena ligera de anticuerpo quimérico humano #32A1, 32A1L/pEF6KCL producida en el ejemplo 18 se preparó usando el PureLink HiPure Plasmid Kit (Invitrogen, Inc.). The 32A1H/pEF1/FCCU (15 μg) y el 32A1L/pEF6KCL (45 μg) fue suspendido en 1 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen, Inc.), y la suspensión resultante se añadió a 1 ml del líquido mixto de polietilenimin/Opti-Pro SFM que había sido dejado a temperatura ambiente durante 5 minutos, y la mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos adicionales. Subsecuentemente, 2 ml del líquido mixto de polietilenimina/los vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadió a cada lote de la suspensión de células 293 FreeStyle, y el cultivo en agitación se continuó. Después de que las células se cultivaron durante 7 días a 37°C en 8% de CO_2, el sobrenadante de cultivo fue recolectado de cada lote.

b) Purificación de anticuerpo quimérico humano

90 ml del sobrenadante de cultivo (para tres lotes) obtenido anteriormente se filtró a través de un filtro (fabricado por NALGENE, Inc., #295-4545), y 0.5 ml de MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-science Co., Ltd., #17-5438-01) equilibrado con PBS se añadió al filtrado, y la mezcla resultante se agitó durante la noche a 80 rpm y 10°C. El día siguiente, el vehículo fue recolectado y lavado con PBS, y posteriormente, el anticuerpo se eluyó con solución 1 M de arginina (pH 4.0). El material eluido se aplicó a una columna PD-10 (fabricado por GE Healthcare Bio-science Co., Ltd., #17-0851-01) para reemplazar el líquido con PBS, y después se concentró con Amicon Ultra-4 (fabricado por Millipore Co., Ltd., #UFC805008), por lo que se obtuvo 1.2 ml de un anticuerpo quimérico humano (0.98 mg/ml). La concentración del anticuerpo se calculó de la medición a 280 nm obtenida usando Hitachi Diode Array BioPhotometer U-0080D.

EJEMPLO 20

Evaluación de propiedad de anticuerpo quimérico humano de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 que se une a proteína Siglec-15 de ratón

La inhibición competitiva del anticuerpo #32A1 de rata contra el anticuerpo quimérico humano purificado preparado en el ejemplo 19 se determinó por el siguiente método. El Siglec-15-Fc de ratón purificado en el ejemplo 4 fue diluido a 1 μg/ml con PBS, la solución diluida se suministró a 100 μl/pozo en una inmunoplaca (fabricada por Nunc, Inc., #437111), y la placa se dejó reposar durante la noche a 4°C, por lo que la proteína fue adsorbida a la placa. El día siguiente, cada pozo se lavó dos veces con una solución PBS-T (PBS, 0.05% (v/v) Tween 20), una solución obtenida por dilución de leche descremada (fabricado por Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) a 5% con PBS se suministró a 350 μl/pozo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. El líquido en cada pozo fue removido, y cada pozo se lavó 3 veces con la solución de PBS-T. Por lo tanto, una solución mixta (una solución de PBS que contiene leche descremada a una concentración final de 0.5%) que contenía el anticuerpo quimérico humano a 0.25 μg/ml y el anticuerpo #32A1 o un IgG de control de rata anticuerpo (fabricado por R&D Systems, Inc., #6-001-A) a una concentración diferente (0 μg/ml, 0.016 μg/ml, 0.05 μg/ml, 0.16 μg/ml, 0.5 μg/ml, 1.66 μg/ml o 5 μg/ml) se suministró a 100 μl/pozo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de cada pozo se lavó 3 veces con la solución de PBS-T, IgG anti-humano de cabra AffiniPure conjugado como fosfatasa alcalina (fabricado por Jackson ImmunoResearch, Inc., #109-055-097) diluido a 2500 veces con una solución de TBS-T (TBS, 0.05% (v/v) Tween 20) se añadió a 100

µl/pozo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. El líquido en cada pozo fue removido, y cada pozo se lavó 5 veces con la solución de TBS-T. Por lo tanto, una solución de sustrato fluorescente (fabricado por Roche Co., Ltd., #11681982001) se añadió a 100 µl/pozo, y una reacción de fluorescencia se dejó proceder. A 10 minutos después de la adición de la solución de sustrato fluorescente, la intensidad de fluorescencia se midió usando un lector de placa. Como resultado, se mostró que el anticuerpo #32A1 inhibe la unión del anticuerpo quimérico humano al Siglec-15-Fc de ratón de una manera dependiente de la concentración. Además, cuyo el anticuerpo #32A1 y el anticuerpo quimérico humano se mezclaron a la misma concentración (1:1), aproximadamente 40% de inhibición competitiva se exhibió. Por lo tanto, se considera que el anticuerpo #32A1 y el anticuerpo quimérico humano tiene sustancialmente la misma afinidad para el Siglec-15-Fc de ratón. Por otra parte, la IgG de control de rata no mostró inhibición competitiva (figura 15).

EJEMPLO 21

Evaluación de actividad biológica de anticuerpo quimérico humano de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 con base en prueba para la formación de osteoclastos de ratón y prueba para formación de osteoclastos humanos

a) Prueba para formación de osteoclastos en ratón

Usando el anticuerpo quimérico humano del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 preparado en el ejemplo 19, el efecto sobre la diferenciación de osteoclastos de células no adherentes de médula ósea de ratón se examinó. Células de médula ósea no adherentes de ratón preparadas por el método del ejemplo 8 se preparó a 1.5 x 10^5 células/ml en un medio α-MEM que

contiene 10% FBS y 10 ng/ml de M-CSF (fabricado por R&D Systems, Inc.), la preparación de células resultante se sembró en cada pozo de una placa de 96 pozos en una cantidad de 200 μl y las células se cultivaron durante 2 días en una incubadora con CO_2. La solución de cultivo vieja en la placa de 96 pozos fue removida, y 100 μl de medio MEM-α se añadió a cada pozo, los 100 μl de medio MEM-α que contenía 10% de FBS al cual RANKL humano (RANKL, fabricado por Peprotech, Inc.) y M-CSF se había añadido para dar concentraciones finales de 20 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente. A la solución de cultivo de células, el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 producido en el ejemplo 6 o el anticuerpo quimérico humano del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 preparado en el ejemplo 19 se añadió a una concentración de 3 a 100 ng/ml, y las células se cultivaron durante 3 días adicionales en una incubadora con CO_2. Después de completarse el cultivo, la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos formados se midió por el método descrito en el ejemplo 9. Después de detener la reacción enzimática, una absorbancia de cada pozo a 405 nm se midió, y la medición obtenida se usó como un índice de actividad de TRAP. Los resultados se muestran en la figura 16. Una inhibición de actividad de TRAP dependiente de la dosis se observó a una concentración de 50 ng/ml o superior en el caso de el anticuerpo #32A1 y el anticuerpo quimérico humano del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1. De este resultado, se mostró que el anticuerpo quimérico humano del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 tiene una actividad de inhibir la formación de osteoclastos (diferenciación de osteoclastos y maduración) sustancialmente comparable con la del anticuerpo #32A1 de rata.

b) Evaluación usando células precursoras de osteoclastos humanos normales (tinción de TRAP)

Las células precursoras de osteoclastos humanas normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) se sembraron en una placa de 96 pozos a 1 x 10^4 células/pozo de conformidad con el protocolo unido a las células. Como el medio, se usó un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) complementadas con un conjunto de complemento OPGM (comprado de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) que contenía suero de bovino fetal (concentración final: 10%), RANKL humana (concentración final: 66 ng/ml), M-CSF humana (concentración final: 33 ng/ml), y similares. Al sobrenadante de cultivo resultante, el anticuerpo quimérico humano del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 preparado en el ejemplo 19 se añadió a una concentración final de 0.3, 1, 3, o 10 μg/ml, y las células se cultivaron durante 3 días en una incubadora con CO_2. Después del cultivo, el sobrenadante fue removido, y 10% de formalina neutra se añadió para fijar las células. Después de fijar las células, las células se lavaron dos veces con agua destilada, una solución de tinción de TRAP (0.27 mM fosfato de naftol AS-MX o (fabricado por Sigma Co., Ltd.), 1.6 mM de sal de LB rojo violeta resistente (fabricado por Sigma Co., Ltd.), 1% de dimetilformamida, 50 mM de tartrato de sodio, 0.1 M de regulador de pH de acetato de sodio (pH 5.0)) se añadió at 100 μl/pozo, y a reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la reacción, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y después se observaron por microscopia (figura 17). Como resultado, la formación de osteoclastos multinucleados TRAP-positivos fue inhibida mediante la adición del anticuerpo quimérico humano de #32A1 dentro del intervalo de 0.3 μg/ml a 10 μg/ml.

EJEMPLO 22

Diseño de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 (1)

a) Diseño de versión humanizada de #32A1

a)-i) Modelado molecular de región variable de #32A1

El modelado molecular de la región variable de #32A1 se realizó por un método generalmente conocido como modelado de homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Las secuencias primarias (estructuras tridimensionales derivadas de las estructuras de cristal de rayos X están disponibles) de las regiones variables de inmunoglobulina humana registrada en el Protein Data Bank (Banco de Datos de Proteínas) (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)) se compararon con la región variable de #32A1 determinada anteriormente. Como resultado, 1LK3 se seleccionó como teniendo la homología de secuencia más alta con la región variable de la cadena ligera de #32A1 entre anticuerpos que tenían una deleción similar en el marco de trabajo. Además, 1AD0 se seleccionó como teniendo la homología de secuencia más alta con la región variable de la cadena pesada de #32A1. La estructura tridimensional de la región del marco de trabajo se generó al obtener el "modelo de marco de trabajo" combinando las coordenadas de 1LK3 y 1AD0 correspondientes a las cadenas ligera y pesada de #32A1. Las CDRs de #32A1 se clasificaron de conformidad con la clasificación de Thornton et al. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)) como sigue: CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, y CDRH2 fueron asignadas a las agrupaciones 15A, 7A, 9A, 10A y 12B, respectivamente. CDRH3 se clasificó en k(8)C de conformidad con las reglas de H3 (FEBS letter 399, 1-8 (1996)). Después, las conformaciones representativas de los CDRs respectivos se integraron en el modelo de marco de trabajo.

Finalmente, para obtener un probable modelo molecular de la región

variable de #32A1 en términos de energía, un cálculo de energía se realizó para excluir contacto interatómico desventajoso. El procedimiento anterior se realizó usando el programa de predicción de estructura de proteína tridimensional comercialmente disponible Prime y el programa de búsqueda de coordenadas MacroModel (Schrodinger, LLC).

a)-ii) Diseño de secuencia de aminoácidos de #32A1 humanizado

Un anticuerpo humanizado #32A1 se construyó de conformidad con un método generalmente conocido como injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Un anticuerpo aceptor se seleccionó en dos formas basadas en la homología de aminoácido dentro de la región del marco de trabajo. La secuencia de la región del marco de trabajo de #32A1 se comparó con la secuencias de todos los marcos de trabajo humanos en la Kabat Database (Base de datos de Kabat) (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)) que implica secuencias de aminoácidos de anticuerpo. Como resultado, un anticuerpo M37GO37'CL se seleccionó como un aceptor basado en una homología de secuencia de 73% en la región de marco de trabajo. Los residuos de aminoácidos en la región de marco de trabajo de M37GO37'CL se alinearon con los residuos de aminoácidos de #32A1, y las posiciones en donde diferentes aminoácidos se usaron fueron identificados. Las posiciones de estos residuos se analizaron usando el modelo tridimensional de #32A1 construido anteriormente. Después, los residuos donadores que han de ser injertados en el aceptor se seleccionaron de conformidad con los criterios provistos por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

La secuencia de la región de marco de trabajo de #32A1 se comparó con las secuencias de todos los marcos de trabajo humanos en el IgBLAST (Nuc. Acid Res.36, D25-D30 (2007)). Como resultado, para la cadena L, AAB34430 se seleccionó como un aceptor basado en una homología de secuencia de 79% en la

región de marco de trabajo. En cuanto a la cadena H, CAF31288 se seleccionó como un aceptor basado en una homología de secuencia de 78% en la región de marco de trabajo. Con respecto a la cadena L, los residuos de aminoácidos en la región de marco de trabajo de AAB34430, y con respecto a la cadena H, los residuos de aminoácidos en la región de marco de trabajo de CAF31288, se alinearon con los residuos de aminoácidos de #32A1, y se identificaron las posiciones en donde diferentes aminoácidos se usaron. Las posiciones de estos residuos se analizaron usando el modelo tridimensional de #32A1 construido anteriormente. Después, los residuos donadores que habían de ser injertados en el acceptor se seleccionaron de conformidad con los criterios provistos por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). En estos métodos, al transferir algunos residuos donadores seleccionados al anticuerpo aceptor, secuencias #32A1 humanizadas se construyeron como se describe en los siguientes ejemplos.

b) Humanización de cadena pesada #32A1

b)-i) Cadena pesada tipo h#32A1-T1H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 43 (treonina), 61 (ácido glutámico), 89 (valina), 95 (ácido aspártico), 96 (serina), 97 (ácido glutámico), 98 (serina), 100 (valina), 104 (valina), 105 (serina), 114 (isoleucina), 118 (treonina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con leucina, valina, serina, glutamina, alanina, glicina, fenilalanina, asparagina, alanina, lisina, asparagina, leucina, metionina, asparagina, valina, alanina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó “cadena pesada tipo h#32A1-T1H”.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h#32A1-T1H está representada por SEQ ID NO: 51 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 19 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 141 a 470 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena pesada, y la región constante de cadena pesada, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 está representada por SEQ ID NO: 50 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 57 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 50, la secuencia que comprende los nucleótidos 58 a 420 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 421 a 1410 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena pesada, y la secuencia de región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 50 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 también se muestran en la figura 27.

b)-ii) Cadena pesada tipo h#32A1-T2H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 43 (treonina), 95 (ácido aspártico), 96 (serina), 97 (ácido glutámico), 98 (serina), 100 (valina), 104 (valina), 114 (isoleucina), 118 (treonina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con leucina, valina, serina, glutamina, alanina, asparagina, alanina, lisina, asparagina, leucina, metionina, valina, alanina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó "cadena pesada tipo h#32A1-T2H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h#32A1-T2H está representada por SEQ ID NO: 53 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 19 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 141 a 470 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena pesada, y la región constante de cadena pesada, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 está representada por SEQ ID NO: 52 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 57 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 52, la secuencia que comprende los nucleótidos 58 a 420 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 421 a 1410 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena pesada, y la secuencia de región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 52 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 también se muestran en la figura 28.

b)-iii) Cadena pesada tipo h#32A1-T3H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 104 (valina), 114 (isoleucina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con valina, serina, glutamina, metionina, valina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó " cadena pesada tipo h#32A1-T3H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h#32A1-T3H está representada por SEQ ID NO: 55 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 19 de la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 55, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 141 a 470 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena pesada, y la región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 está representada por SEQ ID NO: 54 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 57 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 54, la secuencia que comprende los nucleótidos 58 a 420 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 421 a 1410 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena pesada, y la secuencia de región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 54 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 también se muestran en la figura 29.

b)-iv) Cadena pesada tipo h#32A1-T5H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 61 (ácido glutámico), 89 (valina), 95 (ácido aspártico), 97 (ácido glutámico), 99 (serina), 104 (valina), 105 (serina), 114 (isoleucina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con valina, valina, serina, glutamina, glicina, fenilalanina, asparagina, lisina, treonina, metionina, asparagina, valina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó “cadena pesada tipo h#32A1-T5H”.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h#32A1-T5H está representada por SEQ ID NO: 57 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 19 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 20 a

140 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 141 a 470 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena pesada, y la región constante de cadena pesada, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 está representada por SEQ ID NO: 56 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 57 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 56, la secuencia que comprende los nucleótidos 58 a 420 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 421 a 1410 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena pesada, y la secuencia de región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 56 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 también se muestran en la figura 30.

b)-v) Cadena pesada tipo h#32A1-T6H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 95 (ácido aspártico), 97 (ácido glutámico), 99 (serina), 104 (valina), 114 (isoleucina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con valina, valina, serina, glutamina, asparagina, lisina, treonina, metionina, valina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó “cadena pesada tipo h#32A1-T6H”.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h#32A1-T6H está representada por SEQ ID NO: 59 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 19 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 141 a 470 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de

cadena pesada, y la región constante de cadena pesada, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 está representada por SEQ ID NO: 58 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 57 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 58, la secuencia que comprende los nucleótidos 58 a 420 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 421 a 1410 de la misma codifican una secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena pesada, y la secuencia de región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 58 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 también se muestran en la figura 31.

b)-vi) Cadena pesada tipo h#32A1-T7H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 43 (treonina), 89 (valina), 95 (ácido aspártico), 96 (serina), 97 (ácido glutámico), 98 (serina), 100 (valina), 104 (valina), 105 (serina), 114 (isoleucina), 118 (treonina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con leucina, valina, serina, glutamina, alanina, fenilalanina, asparagina, alanina, lisina, asparagina, leucina, metionina, asparagina, valina, alanina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó "cadena pesada tipo h#32A1-T7H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h#32A1-T7H está representada por SEQ ID NO: 72 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 121 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 122 a 451 de la misma corresponden a la región variable de cadena pesada y la región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 72 también se muestra en la figura 38.

b)-vii) Cadena pesada tipo h#32A1-T8H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 43 (treonina), 61 (ácido glutámico), 95 (ácido aspártico), 96 (serina), 97 (ácido glutámico), 98 (serina), 100 (valina), 104 (valina), 105 (serina), 114 (isoleucina), 118 (treonina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con leucina, valina, serina, glutamina, alanina, glicina, asparagina, alanina, lisina, asparagina, leucina, metionina, asparagina, valina, alanina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó "cadena pesada tipo h#32A1-T8H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h#32A1-T8H está representada por SEQ ID NO: 73 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 121 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 122 a 451 de la misma corresponden a la región variable de cadena pesada y la región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 también se muestra en la figura 38.

b-viii) Cadena pesada de tipo h#32A1-T9H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 43 (treonina), 61 (ácido glutámico), 89 (valina), 95 (ácido aspártico), 96 (serina), 97 (ácido glutámico), 98 (serina), 100 (valina), 104 (valina), 114 (isoleucina), 118 (treonina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con leucina,

valina, serina, glutamina, alanina, glicina, fenilalanina, asparagina, alanina, lisina, asparagina, leucina, metionina, valina, alanina, treonina, leucina y serina respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo h#32A1-T9H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo h#32A1-T9H está representada por SEQ ID NO: 74 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 121 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 122 a 451 de la misma corresponden a la región variable de cadena pesada y la región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 también se muestra en la figura 38.

b)-ix) Cadena pesada de tipo h#32A1-T10H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 43 (treonina), 95 (ácido aspártico), 96 (serina), 97 (ácido glutámico), 98 (serina), 100 (valina), 104 (valina), 105 (serina), 114 (isoleucina), 118 (treonina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con leucina, valina, serina, glutamina, alanina, asparagina, alanina, lisina, asparagina, leucina, metionina, asparagina, valina, alanina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo h#32A1-T10H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo h#32A1-T10H está representada por SEQ ID NO: 75 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 121 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 122 a 451 de la misma corresponden a la región variable de cadena pesada y la región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 también se muestra en la figura 39.

b)-x) Cadena pesada de tipo h#32A1-T11H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 43 (treonina), 89 (valina), 95 (ácido aspártico), 96 (serina), 97 (ácido glutámico), 98 (serina), 100 (valina), 104 (valina), 114 (isoleucina), 118 (treonina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con leucina, valina, serina, glutamina, alanina, fenilalanina, asparagina, alanina, lisina, asparagina, leucina, metionina, valina, alanina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo h#32A1-T11H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo h#32A1-T11H está representada por SEQ ID NO: 76 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 121 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 122 a 451 de la misma corresponden a la región variable de cadena pesada y la región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 también se muestra en la figura 39.

b)-xi) Cadena pesada de tipo h#32A1-T12H:

Una cadena pesada #32A1 humanizada diseñada al reemplazar residuos de aminoácidos 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 43 (treonina), 61 (ácido glutámico), 95 (ácido aspártico), 96 (serina), 97 (ácido glutámico), 98 (serina), 100 (valina), 104 (valina), 114 (isoleucina), 118 (treonina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de la cadena pesada #32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con leucina, valina, serina, glutamina, alanina, glicina, asparagina, alanina, lisina, asparagina, leucina,

metionina, valina, alanina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo h#32A1-T12H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo h#32A1-T12H está representada por SEQ ID NO: 77 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 121 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 122 a 451 de la misma corresponden a la región variable de cadena pesada y la región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 también se muestra en la figura 39.

c) Humanización de cadena ligera #32A1

c)-i) Cadena ligera de tipo h#32A1-T1L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 41 (serina), 66 (glutamina), 68 (arginina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 122 (alanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, asparagina, prolina, lisina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, tirosina, glicina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T1L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T1L está representada por SEQ ID NO: 61 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, la secuencia que comprende residuos de

aminoácidos 21 a 133 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 134 a 238 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 está representada por SEQ ID NO: 60 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 60 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 60, la secuencia que comprende los nucleótidos 61 a 399 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 400 a 714 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera secuencia, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 60 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 también se muestran en la figura 32.

c)-ii) Cadena ligera de tipo h#32A1-T2L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 66 (glutamina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T2L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T2L está representada por SEQ ID NO: 63 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 63, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 134 a 238 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 está representada por SEQ ID NO: 62 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 60 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 62, la secuencia que comprende los nucleótidos 61 a 399 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 400 a 714 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera secuencia, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 62 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 también se muestran en la figura 33.

c)-iii) Cadena ligera tipo h#32A1-T3L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con ácido aspártico, serina, ácido glutámico, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T3L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T3L está representada por SEQ ID NO: 65 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, la secuencia que comprende residuos de

aminoácidos 21 a 133 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 134 a 238 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 está representada por SEQ ID NO: 64 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 60 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 64, la secuencia que comprende los nucleótidos 61 a 399 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 400 a 714 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera secuencia, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 64 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 también se muestran en la figura 34.

c)-iv) Cadena ligera de tipo h#32A1-T4L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 36 (glutamina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con ácido glutámico, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T4L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T4L está representada por SEQ ID NO: 67 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 21 a 132 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 133 a 237 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la

región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 está representada por SEQ ID NO: 66 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 60 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 66, la secuencia que comprende los nucleótidos 61 a 396 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 397 a 711 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera secuencia, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 66 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 también se muestran en la figura 35.

c)-v) Cadena ligera de tipo h#32A1-T5L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 41 (serina), 66 (glutamina), 68 (arginina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 110 (fenilalanina), 122 (alanina), 123 (glicina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con ácido aspártico, serina, ácido glutámico, asparagina, prolina, lisina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, tirosina, glicina, glutamina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T5L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T5L está representada por SEQ ID NO: 69 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de

aminoácidos 134 a 238 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 está representada por SEQ ID NO: 68 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 60 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 68, la secuencia que comprende los nucleótidos 61 a 399 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 400 a 714 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera secuencia, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 68 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 también se muestran en la figura 36.

c)-vi) Cadena ligera de tipo h#32A1-T6L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 66 (glutamina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T6L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T6L está representada por SEQ ID NO: 71 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de

aminoácidos 134 a 238 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 está representada por SEQ ID NO: 70 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 60 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 70, la secuencia que comprende los nucleótidos 61 a 399 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 400 a 714 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera secuencia, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 70 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 también se muestran en la figura 37.

c)-vii) Cadena ligera de tipo h#32A1-T7L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 66 (glutamina), 68 (arginina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 122 (alanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, lisina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, tirosina, glicina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T7L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T7L está representada por SEQ ID NO: 78 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 también se muestra en la figura 40.

c)-viii) Cadena ligera de tipo h#32A1-T8L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 41 (serina), 66 (glutamina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 122 (alanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, asparagina, prolina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, tirosina, glicina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T8L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T8L está representada por SEQ ID NO: 79 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 también se muestra en la figura 40.

c)-ix) Cadena ligera de tipo h#32A1-T9L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 41 (serina), 66

(glutamina), 68 (arginina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 122 (alanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, asparagina, prolina, lisina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, glicina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T9L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T9L está representada por SEQ ID NO: 80 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 también se muestra en la figura 40.

c)-x) Cadena ligera de tipo h#32A1-T10L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 41 (serina), 66 (glutamina), 68 (arginina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, asparagina, prolina, lisina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, tirosina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T10L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T10L está representada por SEQ ID NO: 81 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 también se muestra en la figura 40.

c)-xi) Cadena ligera de tipo h#32A1-T11L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 66 (glutamina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 122 (alanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, tirosina, glicina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T11L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T11L está representada por SEQ ID NO: 82 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82 también se muestra en la figura 40.

c)-xii) Cadena ligera de tipo h#32A1-T12L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 66 (glutamina), 68 (arginina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 122 (alanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, lisina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, glicina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T12L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T12L está representada por SEQ ID NO: 83 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 también se muestra en la figura 41.

c)-xiii) Cadena ligera de tipo h#32A1-T13L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 66 (glutamina), 68 (arginina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con

metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, lisina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, tirosina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T13L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T13L está representada por SEQ ID NO: 84 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 también se muestra en la figura 41.

c)-xiv) Cadena ligera de tipo h#32A1-T14L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 41 (serina), 66 (glutamina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 122 (alanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, asparagina, prolina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, glicina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T14L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T14L está representada por SEQ ID NO: 85 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena

ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 también se muestra en la figura 41.

c)-xv) Cadena ligera de tipo h#32A1-T15L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 41 (serina), 66 (glutamina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, asparagina, prolina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, tirosina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T15L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T15L está representada por SEQ ID NO: 86 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 también se muestra en la figura 41.

c)-xvi) Cadena ligera de tipo h#32A1-T16L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 41 (serina), 66 (glutamina), 68 (arginina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101

(valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, asparagina, prolina, lisina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T16L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T16L está representada por SEQ ID NO: 87 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 también se muestra en la figura 41.

c)-xvii) Cadena ligera de tipo h#32A1-T17L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 66 (glutamina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 122 (alanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, glicina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T17L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T17L está representada por SEQ ID NO: 88 en el listado de secuencias. La

secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88 también se muestra en la figura 42.

c)-xviii) Cadena ligera de tipo h#32A1-T18L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 66 (glutamina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, tirosina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T18L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T18L está representada por SEQ ID NO: 89 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89 también se muestra en la figura 42.

c)-xix) Cadena ligera de tipo h#32A1-T19L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción

de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 66 (glutamina), 68 (arginina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, prolina, lisina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T19L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T19L está representada por SEQ ID NO: 90 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 también se muestra en la figura 42.

c)-xx) Cadena ligera de tipo h#32A1-T20L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), 29 (alanina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 36 (glutamina), 41 (serina), 66 (glutamina), 81 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, asparagina, prolina, valina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, valina, valina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T20L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T20L está representada por SEQ ID NO: 91 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 también se muestra en la figura 42.

c)-xxi) Cadena ligera de tipo h#32A1-T21L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 21 (ácido aspártico), 24 (leucina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 31 (alanina), 32 (valina), 34 (leucina), 36 (glutamina), 40 (isoleucina), 66 (glutamina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 102 (glutamina), 103 (alanina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 122 (alanina), 123 (glicina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con ácido glutámico, metionina, treonina, serina, leucina, prolina, ácido glutámico, leucina, alanina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, prolina, ácido glutámico, fenilalanina, leucina, tirosina, glicina, glutamina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T21L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T21L está representada por SEQ ID NO: 92 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 92 también se muestra en la figura 42.

c)-xxii) Cadena ligera de tipo h#32A1-T22L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 21 (ácido aspártico), 24 (leucina), entre 29 y 30 (es decir, inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 31 (alanina), 32 (valina), 34 (leucina), 36 (glutamina), 40 (isoleucina), 66 (glutamina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 102 (glutamina), 103 (alanina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 123 (glicina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con ácido glutámico, metionina, treonina, serina, leucina, prolina, ácido glutámico, leucina, alanina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, prolina, ácido glutámico, fenilalanina, leucina, glutamina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T22L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T22L está representada por SEQ ID NO: 93 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93 también se muestra en la figura 43.

c)-xxiii) Cadena ligera de tipo h#32A1-T23L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 24 (leucina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 31 (alanina), 32 (valina), 34

(leucina), 36 (glutamina), 40 (isoleucina), 66 (glutamina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 102 (glutamina), 103 (alanina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con metionina, treonina, serina, leucina, prolina, ácido glutámico, leucina, alanina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, prolina, ácido glutámico, fenilalanina, leucina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T23L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T23L está representada por SEQ ID NO: 94 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94 también se muestra en la figura 43.

c)-xxiv) Cadena ligera de tipo h#32A1-T24L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 21 (ácido aspártico), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 31 (alanina), 32 (valina), 34 (leucina), 36 (glutamina), 40 (isoleucina), 66 (glutamina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 102 (glutamina), 103 (alanina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 122 (alanina), 123 (glicina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con ácido glutámico, treonina, serina, leucina, prolina, ácido glutámico, leucina, alanina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, prolina, ácido glutámico, fenilalanina, leucina, tirosina,

glicina, glutamina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T24L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T24L está representada por SEQ ID NO: 95 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95 también se muestra en la figura 43.

c)-xxv) Cadena ligera de tipo h#32A1-T25L:

Una cadena ligera #32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 31 (alanina), 32 (valina), 34 (leucina), 36 (glutamina), 40 (isoleucina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 102 (glutamina), 103 (alanina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 110 (fenilalanina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de la cadena ligera #32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con treonina, serina, leucina, prolina, ácido glutámico, leucina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, prolina, ácido glutámico, fenilalanina, tirosina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-T25L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-T25L está representada por SEQ ID NO: 96 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 114 a 218 de la misma corresponden a la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 96 también se muestra en la figura 43.

EJEMPLO 23

Producción de gen de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1

a) Construcción de vectores de expresión de cadena ligera de tipo h#32A1-T1L, h#32A1-T2L, h#32A1-T3L, h#32A1-T4L, h#32A1-T5L y h#32A1-T6L

Cada ADN que contiene un gen que codifica una región variable de cadena ligera de tipo h#32A1-T1L, h#32A1-T2L, h#32A1-T3L, h#32A1-T4L, h#32A1-T5L o h#32A1-T6L fusionada a una señal secretora representada por: los aminoácidos números 1 a 133 de SEQ ID NO: 61 en el listado de secuencias; los aminoácidos números 1 a 133 de SEQ ID NO: 63; los aminoácidos números 1 a 133 de SEQ ID NO: 65; los aminoácidos números 1 a 132 de SEQ ID NO: 67; los aminoácidos números 1 a 133 de SEQ ID NO: 69; o los aminoácidos números 1 a 133 de SEQ ID NO: 71 se sintetizaron (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Artificial Gene Synthesis Service). Después, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos por digestión de los ADNs sintetizados con las enzimas de restricción NheI y BsiWI se insertó en un vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio digerido con las enzimas de restricción NheI y BsiWI, por lo que se construyeron vectores de expresión de cadena ligera de tipo h#32A1-T1L, h#32A1-T2L, h#32A1-T3L, h#32A1-T4L, h#32A1-T5L y h#32A1-T6L. Los vectores de expresión así obtenidos se nombraron “pEF6KCL/h#32A1-T1L”, “pEF6KCL/h#32A1-T2L”, “pEF6KCL/h#32A1-T3L”, “pEF6KCL/h#32A1-T4L”, “pEF6KCL/h#32A1-T5L”, y “pEF6KCL/h#32A1-T6L”, respectivamente.

b) Construcción de vectores de expresión de cadena pesada h#32A1-T1H, h#32A1-T2H, h#32A1-T3H, h#32A1-T5H y h#32A1-T6H

Cada ADN que contiene un gen que codifica una h#32A1-T1H, h#32A1-T2H, h#32A1-T3H, h#32A1-T5H, o región variable de cadena pesada de tipo h#32A1-T6H fusionada a una señal secretora representada por los aminoácidos números 1 a 140 de SEQ ID NO: 51, 53, 55, 57 o 59 en el listado de secuencias se sintetizaron (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Artificial Gene Synthesis Service). Después, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos por digestión de los ADNs sintetizados con la enzima de restricción BlpI se insertó en un vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo humanizado universal (pEF1/FCCU-1) en el sitio digerido con la enzima de restricción BlpI, por lo que se construyeron vectores de expresión de cadena pesada h#32A1-T1H, h#32A1-T2H, h#32A1-T3H, h#32A1-T5H y h#32A1-T6H. Los vectores de expresión así obtenidos se nombraron "pEF1/FCCU/h#32A1-T1H", "pEF1/FCCU/h#32A1-T2H", "pEF1/FCCU/h#32A1-T3H", "pEF1/FCCU/h#32A1-T5H", y "pEF1/FCCU/h#32A1-T6H", respectivamente.

EJEMPLO 24

Preparación de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1

a) Producción de anticuerpo humanizado

1.5 x 10^8 células de células 293 FreeStyle en fase de crecimiento logarítmica se sembró en 100 ml de medio de expresión FreeStyle 293 fresco (Invitrogen, Inc.) y se sometió a cultivo en agitación (125 rpm) a 37ºC en una incubadora con 8% de CO2. 1 mg de polietilenimina (fabricado por Polyscience, Inc. #24765) se disolvió en 4 ml de medio Opti-Pro SFM (fabricado por Invitrogen,

Inc.), y la solución resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Un plásmido de expresión de cadena pesada (0.05 mg) y un plásmido de expresión de cadena ligera (0.15 mg) preparados usando PureLink HiPure Plasmid Kit (Invitrogen, Inc.) fue suspendido en 4 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen, Inc.). Después, 4 ml de los plásmidos de expresión resultantes/líquido mixto de Opti-Pro SFM se añadió a 4 ml de la polietilenimina/líquido mixto de Opti-Pro SFM que se había dejado a temperatura ambiente durante 5 minutos, y la mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos adicionales. Subsecuentemente, 8 ml de la polietilenimina/los plásmidos de expresión/líquido mixto de Opti-Pro SFM se añadió a la suspensión de células 293 FreeStyle, y el cultivo en agitación se continuó. Después de que las células se cultivaron durante 7 días a 37°C en 8% de CO_2, el sobrenadante de cultivo se recolectó.

b) Purificación de anticuerpo humanizado

El sobrenadante de cultivo obtenido en a) anterior se purificó por cromatografía de afinidad de proteína A. 100 ml del sobrenadante de cultivo se puso en un matraz con tapón de 500 ml, y 1 ml de una suspensión (50% de suspensión) de MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-science Co., Ltd.) equilibrado con PBS se añadió al mismo. La mezcla resultante se agitó durante la noche a 100 rpm en una incubadora a 10°C. Después, el sobrenadante de cultivo 293F/suspensión de MabSelect SuRe se aplicó a Zeba Spin Column vacía de 5 mL (PIERCE, Inc.). Después de que se vació toda la resina en la columna, la columna se lavó con 10 ml de NaCl 1 M. Subsecuentemente, 1 ml de solución de arginina 1 M (pH 4.0) se aplicó a la columna, y una fracción que contenía el anticuerpo fue recolectada. La fracción se añadió a un dispositivo de filtro de centrífuga (Amicon Ultra-4, peso molecular fraccionado: 50 K, Millipore Co., Ltd.), y reemplazo de líquido con un regulador de pH de citrato y

condensación se realizaron. El volumen final se hizo hasta 200 µl, que se usó como una muestra purificada.

Un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-T1L y pEF1/FCCU/h#32A1-T1H se denominó "h#32A1-T1"; un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-T2L y pEF1/FCCU/h#32A1-T2H se denominó "h#32A1-T2"; un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-T3L y pEF1/FCCU/h#32A1-T3H se denominó "h#32A1-T3"; un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-T4L y pEF1/FCCU/h#32A1-T3H se denominó "h#32A1-T4"; un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-T5L y pEF1/FCCU/h#32A1-T5H se denominó "h#32A1-T5"; y un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-T6L y pEF1/FCCU/h#32A1-T6H se denominó "h#32A1-T6".

EJEMPLO 25

Evaluación de propiedad de unión de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 a proteína Siglec-15 de ratón

La propiedad de unión de los anticuerpos humanizados de anti-ratón Siglec-15 #32A1 T1 a T6 de rata a Siglec-15-Fc de ratón y Siglec-15-Fc humana fue evaluado por el siguiente método. La Siglec-15-Fc de ratón purificada en el ejemplo 4 o la Siglec-15-Fc humana purificada en el ejemplo 12 se diluyó a 1 µg/ml con PBS, y la solución diluida se suministró a 100 µl/pozo sobre una inmunoplaca (fabricada por Nunc, Inc., #437111), y la placa se dejó reposar durante la noche a 4°C, por lo que cada proteína fue adsorbida a la placa. El día siguiente, cada pozo se lavó 5 veces con una solución de PBS-T (PBS, 0.05%

(v/v) Tween 20), y una solución obtenida al diluir leche descremada (fabricada por Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) a 5% con PBS se suministró a 350 μl/pozo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. El líquido en cada pozo fue removido, y cada pozo se lavó 5 veces con la solución de PBS-T. Por lo tanto, cada uno de los anticuerpo humanizados purificados de la anti-ratón Siglec-15 #32A1 T1 a T6 de rata preparados en el ejemplo 24 o el anticuerpo quimérico humano preparado en el ejemplo 19 se diluyó a una concentración final de 1 a 0.004 μg/ml (series de dilución de 4 veces) con una solución de PBS que contiene 0.5% leche descremada, la solución diluida se suministró a 100 μl/pozo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. En este tiempo, la concentración de cada anticuerpo se determinó al realizar medición a 280 nm usando un espectrofotómetro DU-7400 (fabricado por Beckman Coulter, Inc.) y realizando cálculos basados en un coeficiente de extinción molecular molar de cada anticuerpo. Después de que cada pozo había sido lavado 5 veces con la solución de PBS-T, IgG anti-humano de cabra AffiniPure conjugado como fosfatasa alcalina (fabricada por Jackson ImmunoResearch, Inc., #109-055-097) se diluyó a 2500 veces con una solución de TBS-T (TBS, 0.05% (v/v) Tween 20) se añadió a 100 μl/pozo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. El líquido en cada pozo fue removido, y cada pozo se lavó 5 veces con la solución de TBS-T. Por lo tanto, una solución de sustrato fluorescente (fabricado por Roche Co., Ltd., #11681982001) se añadió a 100 μl/pozo, y una reacción de fluorescencia se dejó proceder. Después de 10 minutos de la adición de la solución de sustrato fluorescente en el caso de la placa que tenía el Siglec-15-Fc de ratón adsorbido a la misma, y después de 15 minutos en el caso de la placa que tenía la Siglec-15-Fc humana adsorbida a la misma, una intensidad de fluorescencia se midió usando Spectra Max M5 (fabricado por Molecular Devices, Inc.). Como resultado, se confirmó que todos los seis anticuerpos humanizados de

la anti-ratón Siglec-15 de rata examinados se unen a la proteína Siglec-15 de ratón (figura 18) y la proteína Siglec-15 humana (figura 19) de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo.

EJEMPLO 26

Efecto de la adición de anticuerpo quimérico de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 sobre la diferenciación de osteoclastos de células no adherentes de médula ósea de ratón (estimulación con FNTα)

Usando el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 preparado en el ejemplo 6 y el anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 preparado en el ejemplo 19, se examinó un efecto sobre la diferenciación de osteoclastos de células no adherentes de médula ósea de ratón por estimulación con FNTα. Las células no adherentes de médula ósea de ratón preparadas por el método del ejemplo 8 se preparó a 1.5 x 10^5 células/ml en medio α-MEM que contenía 10% de suero de bovino fetal (FBS), 10 ng/ml de M-CSF, y 2 ng/ml de TGF-β (fabricado por R&D Systems, Inc.), la preparación de células resultante se sembró en cada pozo de una placa de 96 pozos en una cantidad de 200 μl y las células se cultivaron durante 2 días en una incubadora de CO_2. La solución de cultivo vieja en la placa de 96 pozos fue removida, y 100 μl de medio MEM-α se añadió a cada pozo, los 100 μl de medio MEM-α que contenía 10% de FBS al cual se había añadido TNF α humano recombinante (fabricado por R&D Systems, Inc.) y M-CSF para dar concentraciones finales de 30 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente. A la solución de cultivo de células, el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 preparado en el ejemplo 9 o el anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 preparado en el ejemplo 19 se añadió a una concentración de 0.125 a 4 μg/ml, y las células se cultivaron durante 3 días

adicionales en una incubadora de CO_2. Al mismo tiempo, un pozo en el cual las células se cultivaron añadiendo OCIF/OPG humano recombinante preparado por el método descrito en la descripción de la publicación de solicitud de patente No. WO 96/26217 a una concentración de 100 ng/ml también se preparó. Después de completarse el cultivo, se realizó tinción de TRAP usando un kit de fosfatase ácida de leucocitos (fabricado por Sigma Co., Ltd.) de conformidad con el protocolo que acompaña el kit, y se observó la formación de osteoclastos multinucleados TRAP-positivos. Como resultado, la formación de osteoclastos multinucleados gigantes TRAP-positivos fue inhibida mediante la adición del anticuerpo policlonal anti-ratón Siglec-15 (figura 20). Aunque los osteoclastos mononucleares pequeños se formaron incluso en el caso en donde el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 o el anticuerpo quimérico de la misma se añadió, la formación de osteoclastos multinucleados grandes inducidos por FNTα fue casi completamente inhibida. Por otra parte, aun cuando una cantidad suficiente de OCIF/OPG, que es un bloqueador de RANKL, se añadió, la formación de osteoclastos multinucleados grandes fue inhibida sólo un poco. Además, de la misma manera, la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos formados se midió por el procedimiento descrito en el ejemplo 9. Después de detener la reacción enzimática, una absorbancia de cada pozo a 405 nm se midió, y la medición obtenida se usó como un índice de actividad de TRAP. Los resultados se muestran en la figura 21. Una inhibición de actividad de TRAP significativa se observó en el caso del anticuerpo #32A1 y el anticuerpo quimérico de #32A1 dentro del intervalo de 125 ng/ml a 4 μg/ml. A partir de estos resultados, se mostró que el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata y el anticuerpo quimérico de la misma inhiben fuertemente el proceso de fusión celular en diferenciación de osteoclastos y maduración inducidas por FNTα.

EJEMPLO 27

Evaluación de actividad biológica de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas #8A1 y #32A1 basada en prueba para formación de osteoclastos de rata

Usando el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas #8A1 y #32A1 preparado en el ejemplo 6, un efecto sobre diferenciación de osteoclastos de células no adherentes de médula ósea de rata se examinó. Las células no adherentes de médula ósea de rata se prepararon modificando el método del ejemplo 8. Es decir, el fémur fue extirpado de ambas piernas de una rata F344 hembra de 12 semanas de edad y los tejidos blandos fueron removidos. Ambos extremos del fémur se cortaron, y medio MEM-α se inyectó usando una jeringa con una aguja de inyección de calibre 23 para sacar las células de médula ósea, que se recolectaron en un tubo de centrífuga. La centrifugación se realizó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 100 g, y el sobrenadante fue removido. A la pastilla de células resultante, 1 ml de un regulador de pH hemolítico (regulador de pH de lisis de glóbulos rojos, fabricado por Sigma Co., Ltd.) se añadió para suspenderlo, y la suspensión resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. 20 ml de D-PBS se añadió a la misma, la suspensión se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 100 g, y el sobrenadante fue removido. A la pastilla de células resultante, 10 ml de medio MEM-α (fabricado por Invitrogen, Inc.) que contiene 5 ng/ml de M-CSF (fabricado por R&D Systems, Inc.) y 10% suero de bovino fetal (FBS) se añadió para suspenderlo. Después, la suspensión resultante se hizo pasar a través de un colador de células (40 μm Nylon, fabricado por BD Falcon) para remover agregados. Las células resultantes fueron transferidas a un matraz en forma de T de 75 cm^2 (para la unión de células adherentes) y se cultivaron durante la noche

en una incubadora de CO_2. Después de cultivar durante la noche, las células no se adhirieron al matraz en forma de T fueron recuperadas y usadas como células no adherentes de médula ósea de rata.

Las células no adherentes de médula ósea de rata preparadas por este método se cultivaron y una prueba para la formación de osteoclastos de rata se realizó de conformidad con el método del ejemplo 9. Es decir, las células no adherentes de médula ósea de rata así preparadas se prepararon a 1.5 x 10^5 células/ml en un medio α-MEM que contenía 10% de FBS y 10 ng/ml de M-CSF (fabricado por R&D Systems, Inc.), y la preparación de células resultante se sembró en cada pozo de una placa de 96 pozos en una cantidad de 200 μl y las células se cultivaron durante 2 días en una incubadora de CO_2. La solución de cultivo vieja en la placa de 96 pozos fue removida, y 100 μl de medio MEM-α se añadió a cada pozo, los 100 μl de medio MEM-α que contenía 10% de FBS al cual se había añadido RANKL humano (RANKL, fabricado por Peprotech, Inc.) y M-CSF para dar concentraciones finales de 20 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente. A la solución de cultivo de células, el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #8A1 o #32A1 producido en el ejemplo 6 se añadió a una concentración de 31 a 1000 ng/ml, y las células se cultivaron durante 3 días adicionales en una incubadora de CO_2. Después de completarse el cultivo, la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos formados se midió por el método descrito en el ejemplo 9. Después de detener la reacción enzimática, una absorbancia de cada pozo a 405 nm se midió, y la medición obtenida se usó como un índice de actividad de TRAP. Los resultados se muestran en la figura 22. En el caso del anticuerpo #8A1, una inhibición de actividad de TRAP dependiente de la dosis se observó a una concentración de 63 ng/ml o superior, y en el caso de el anticuerpo #32A1, una inhibición de actividad de TRAP dependiente de la dosis se observó a una concentración de 31 ng/ml o superior. A partir de estos resultados,

se mostró que el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de ratas #8A1 y #32A1 inhiben fuertemente la formación de osteoclastos de rata de la misma manera que la formación de osteoclastos de ratón, y la actividad *in vitro* de inhibir la formación de osteoclastos de rata del anticuerpo #32A1 es más alta que la del anticuerpo #8A1.

EJEMPLO 28

Diseño del anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 (2)

a) Diseño de la versión humanizada de #32A1

a)-i) Diseño de secuencia de aminoácidos de #32A1 humanizada

Un anticuerpo humanizado #32A1 se construyó de conformidad con a método generalmente conocido como injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). En cuanto a las definiciones de regiones de CDR, las definiciones de Kabat (SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST VOL. I, QUINTA EDICIÓN (1991)) se usaron para todas excepto para CDRH2. En cuanto a CDRH2, la secuencia de la misma se hizo más corta por cinco residuos en el C terminal que la definición de Kabat usando una definición propia. En la secuencia de cadena pesada que contiene la CDRH2 así definida, la secuencia de CDR derivada de una rata se hace más corta y más de una secuencia de marco de trabajo humana es incorporada, y por lo tanto, cuando se administra a humanos, es mucho menos probable que sea reconocida como un antígeno heterólogo. Un anticuerpo aceptor se seleccionó con base en la homología de aminoácidos dentro de la región de marco de trabajo. La secuencia de la región de marco de trabajo de #32A1 se comparó con las secuencias de todos los marcos de trabajo humanos en la base de datos de Kabat (Nuc. Acid

Res. 29, 205-206 (2001)) que implicaban secuencias de aminoácidos de anticuerpo. Como resultado, para la cadena L, GF4/1.1'CL se seleccionó como un aceptor basado en una homología de secuencia de 71% en la región de marco de trabajo. En cuanto a la cadena H, M37GO37'CL se seleccionó como un aceptor basado en una homología de secuencia de 73% en la región de marco de trabajo. Con respecto a la cadena L, los residuos de aminoácidos en la región de marco de trabajo de GF4/1.1'CL, y con respecto a la cadena H, los residuos de aminoácidos en la región de marco de trabajo de M37GO37'CL se alinearon con los residuos de aminoácidos de #32A1, y las posiciones en donde diferentes aminoácidos se usaron fueron identificadas. Las posiciones de estos residuos se analizaron usando el modelo tridimensional de #32A1 construido en a)-i) del ejemplo 22. Después, residuos donadores que han de ser injertados en el aceptor se seleccionaron de conformidad con los criterios provistos por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Al transferir algunos residuos donadores seleccionados al anticuerpo aceptor, se construyeron secuencias #32A1 humanizadas como se describe en los siguientes ejemplos.

a)-ii) Humanización de cadena pesada #32A1

a)-ii)-i) Cadena pesada de tipo h#32A1-H1-1:

Una cadena pesada 32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 23 (isoleucina), 24 (leucina), 26 (treonina), 32 (lisina), 43 (treonina), 61 (ácido glutámico), 83 (ácido glutámico), 85 (leucina), 86 (ácido glutámico), 89 (valina), 95 (ácido aspártico), 96 (serina), 97 (ácido glutámico), 98 (serina), 100 (valina), 104 (valina), 105 (serina), 114 (isoleucina), 118 (treonina), 134 (valina), 135 (metionina), y 140 (leucina) de 32A1 representada por SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias con leucina, valina, serina, glutamina, alanina, glicina, alanina, valina, lisina, fenilalanina, asparagina, alanina, lisina, asparagina,

leucina, metionina, asparagina, valina, alanina, treonina, leucina y serina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo h#32A1-H1-1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo h#32A1-H1-1 está representada por SEQ ID NO: 99 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 19 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 141 a 466 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena pesada, y la región constante de cadena pesada, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 está representada por SEQ ID NO: 98 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 57 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 98, la secuencia que comprende los nucleótidos 58 a 420 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 421 a 1398 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena pesada, y la secuencia de región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 98 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 también se muestran en la figura 54.

a)-iii) Humanización de cadena ligera #32A1

a)-iii)-i) Cadena ligera de tipo h#32A1-L2-15:

Una cadena ligera 32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 21 (ácido aspártico), 23 (valina), 24 (leucina), entre 29 y 30 (es decir, inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 31 (alanina), 32 (valina), 34 (leucina), 36 (glutamina), 40 (isoleucina), 66 (glutamina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 102 (glutamina), 103 (alanina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 110 (fenilalanina), 122 (alanina),

123 (glicina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de 32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con ácido glutámico, leucina, metionina, treonina, serina, leucina, prolina, ácido glutámico, leucina, alanina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, prolina, ácido glutámico, fenilalanina, leucina, tirosina, glicina, glutamina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-L2-15".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-L2-15 está representada por SEQ ID NO: 103 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 134 a 238 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 está representada por SEQ ID NO: 102 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 60 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 102, la secuencia que comprende los nucleótidos 61 a 399 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 400 a 714 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera secuencia, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 102 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 también se muestran en la figura 56.

a)-iii)-ii) Cadena ligera de tipo h#32A1-L2-16:

Una cadena ligera 32A1 humanizada diseñada al reemplazar los números de aminoácido 21 (ácido aspártico), 23 (valina), 24 (leucina), entre 29 y 30 (es decir inserción de un residuo faltante del marco de trabajo de rata), 31

(alanina), 32 (valina), 34 (leucina), 36 (glutamina), 40 (isoleucina), 66 (glutamina), 99 (asparagina), 100 (prolina), 101 (valina), 102 (glutamina), 103 (alanina), 104 (ácido aspártico), 106 (isoleucina), 108 (treonina), 123 (glicina), 127 (leucina), 129 (leucina), 130 (arginina), y 132 (alanina) de 32A1 representada por SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias con ácido glutámico, leucina, metionina, treonina, serina, leucina, prolina, ácido glutámico, leucina, alanina, serina, serina, leucina, ácido glutámico, prolina, ácido glutámico, fenilalanina, leucina, glutamina, valina, isoleucina, lisina, y treonina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo h#32A1-L2-16".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo h#32A1-L2-16 está representada por SEQ ID NO: 105 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 21 a 133 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 134 a 238 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 está representada por SEQ ID NO: 104 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 60 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 104, la secuencia que comprende los nucleótidos 61 a 399 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 400 a 714 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera secuencia, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 104 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 también se muestran en la figura 57.

b) Producción de gen de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1

b)-i) Construcción de vector de expresión de cadena pesada humana universal pEG2

Un fragmento de ADN que contenía una secuencia de ADN que codificaba aminoácidos de la secuencia de señal y la región constante de IgG2 humana representada por SEQ ID NO: 106 fue sintetizado (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Artificial Gene Synthesis Service), y digerido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, por lo que se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 1100 bp. Este fragmento de ADN fue ligado a un fragmento de ADN de aproximadamente 6200 bp obtenido por digestión de pEF1/FCCU-1 con NheI y PmeI y removiendo un fragmento de ADN de aproximadamente 1100 bp, por lo que se construyó un vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo humanizado pEG2 universal (tipo hIgG2).

b)-ii) Construcción de vector de expresión de cadena pesada h#32A1-H1-1

Un fragmento de ADN obtenido al sintetizar un ADN que contenía un gen que codificaba la región variable de cadena pesada h#32A1-H1-1fusionada a una señal secretora representada por los aminoácidos números 1 a 140 de SEQ ID NO: 99 en el listado de secuencias (Invitrogen), y al digerir el ADN con la enzima de restricción BlpI se insertó en el vector de expresión de cadena pesada (pEG2) humana universal (tipo hIgG2) en el sitio digerido con la enzima de restricción BlpI, por lo que se construyó un vector de expresión de cadena pesada h#32A1-H1-1. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEG2/h#32A1-H1-1".

b)-iii) Construcción de vector de expresión de cadena pesada h#32A1-H5

Una cadena pesada 32A1 humanizada en la cual la secuencia de señal y la región constante de cadena pesada tipo h#32A1-T5H designada en b)-iv) del ejemplo 22 se cambiaron a aquellas del tipo IgG2 se denominó "cadena pesada de tipo h#32A1-H5".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo h#32A1-H5 está representada por SEQ ID NO: 101 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende residuos de aminoácidos 1 a 19 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101, la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 20 a 140 de la misma, y la secuencia que comprende residuos de aminoácidos 141 a 466 de la misma corresponde a la secuencia de señal, la región variable de cadena pesada, y la región constante de cadena pesada, respectivamente. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 está representada por SEQ ID NO: 100 en el listado de secuencias. La secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 57 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 100, la secuencia que comprende los nucleótidos 58 a 420 de la misma, y la secuencia que comprende los nucleótidos 421 a 1398 de la misma codifica la secuencia de señal, la secuencia de región variable de cadena pesada, y la secuencia de región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 100 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 también se muestran en la figura 55.

Un fragmento de ADN obtenido al digerir el pEF1/FCCU/h#32A1-T5H producido en el ejemplo 23 con la enzima de restricción BlpI se insertó en el vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo (tipo hIgG2) (pEG2) en el sitio digerido con la enzima de restricción BlpI, por lo que se construyó un vector de expresión de cadena pesada h#32A1-H5. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEG2/h#32A1-H5".

b)-iv) Construcción de vectores de expresión de cadena ligera de tipo h#32A1-L2-15 y h#32A1-L2-16

Cada ADN que contenía un gen que codificaba una región variable de cadena ligera de tipo h#32A1-L2-15 o h#32A1-L2-16 fusionada a una señal secretora representada por los aminoácidos números 1 a 133 de SEQ ID NO: 103 en el listado de secuencias o los aminoácidos números 1 a 133 de SEQ ID NO: 105 se sintetizó (Invitrogen), y se construyeron vectores de expresión de cadena ligera de tipo h#32A1-L2-15 y h#32A1-L2-16 de la misma manera as en el ejemplo 23. Los vectores de expresión así obtenidos se denominaron "pEF6KCL/h#32A1-L2-15" y "pEF6KCL/h#32A1-L2-16", respectivamente.

c) Preparación de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1

c)-i) Producción de anticuerpo humanizado

1.2 x 10^9 células de células FreeStyle 293F (Invitrogen) en fase de crecimiento logarítmica se sembró en 1.2 L de medio de expresión FreeStyle 293 fresco (Invitrogen) y se sometió a cultivo en agitación a 37°C en una incubadora con 8% de CO_2 a 90 rpm durante 1 hora. 3.6 mg de polietilenimina (Polyscience, #24765) se disolvió en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen). Subsecuentemente, un plásmido de expresión de cadena H (0.4 mg) y un plásmido de expresión de cadena L (0.8 mg) preparado usando PureLink HiPure Plasmid Kit (Invitrogen, Inc.) fue suspendido en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml de los plásmidos de expresión resultantes/líquido mixto de Opti-Pro SFM se añadió a 20 ml de la polietilenimina/líquido mixto de Opti-Pro SFM, y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó durante 5 minutos. Por lo tanto, la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F, y el cultivo en agitación se realizó durante 7 días a 37°C en una incubadora con 8% de CO_2 a 90

rpm. El sobrenadante de cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec #CCS-045-E1H).

Un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-T5L y pEG2/h#32A1-H5 se denominó "h#32A1-H5/L5"; un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-T5L y pEG2/h#32A1-H1-1 se denominó "h#32A1-H1-1/L5"; un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-L2-15 y pEG2/h#32A1-H1-1 se denominó "h#32A1-H1-1/L2-15"; y un anticuerpo humanizado de #32A1 obtenido por una combinación de pEF6KCL/h#32A1-L2-16 y pEG2/h#32A1-H1-1 se denominó "h#32A1-H1-1/L2-16".

c)-ii) Purificación de anticuerpo humanizado

El sobrenadante de cultivo obtenido en c)-i) anterior fue purificado por un procedimiento de dos pasos que incluyó cromatografía de afinidad de rProtein A (a 4 a 6°C) y hidroxiapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Un paso de reemplazo de regulador de pH después de la purificación por cromatografía de afinidad de rProtein A y después de la purificación por hidroxiapatita de cerámica se realizó a temperatura ambiente. Primero, 1100 a 1200 ml del sobrenadante de cultivo se aplicó a MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bioscience Co., Ltd., columnas 2 x 1 ml HiTrap en serie) equilibrado con PBS. Después de que toda la solución de cultivo se vació en la columna, la columna se lavó con 15 a 30 ml de PBS. Subsecuentemente, elución se realizó con solución 2 M de clorhidrato de arginina (pH 4.0), y una fracción que contenía el anticuerpo fue recolectada. La fracción se aplicó a una columna de desalación (fabricada por GE Healthcare Bioscience Co., Ltd., columnas de desalación 2 x 5 ml HiTrap en serie) y el líquido fue reemplazado por un regulador de pH que contenía 5 mM fosfato de sodio, 50 mM MES, y 20 mM NaCl a pH 6.5.

Además, la solución de anticuerpo sometida al reemplazo con el regulador de pH se aplicó a una columna de hidroxiapatita de cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., columna de hidroxiapatita Bio-Scale CHT2-1 (volumen de 2 ml)) equilibrada con a regulador de pH que contenía 5 mM NaPi, 50 mM MES, y 20 mM NaCl a pH 6.5. Después, se realizó la elución de gradiente de concentración con cloruro de sodio, y una fracción que contenía el anticuerpo fue recolectada. La fracción se aplicó a una columna de desalación (fabricada por GE Healthcare Bioscience Co., Ltd., columna de desalación de 2 x 5 ml HiTrap en serie) y el líquido fue reemplazado por CBS (10 mM regulador de pH de citrato que contenía 140 mM cloruro de sodio, pH 6.0). Finalmente, la solución resultante se concentró usando Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN 20(peso molecular fraccionado: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 4°C), la concentración de IgG se ajustó a 1.0 mg/ml o más, y la solución así obtenida se usó como una muestra purificada. Los volúmenes de las muestras purificadas respectivas fueron como sigue: h#32A1-H1-1/L5: 2.2 ml, h#32A1-H5/L5: 1.8 ml, h#32A1-H1-1/L2-16: 6.0 ml, y h#32A1-H1-1/L2-15: 2.2 ml.

EJEMPLO 29

Evaluación de actividad biológica de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 basada en prueba para la formación de osteoclastos de ratón

Un efecto inhibidor sobre la formación de osteoclastos de ratón exhibido por los anticuerpos humanizados obtenidos en los ejemplos 24 y 28 fue evaluado al modificar parcialmente el método descrito en el ejemplo 9. Las células no adherentes de médula ósea de ratón preparadas por el método del ejemplo 8 se prepararon a 1.5 x 10^5 células/ml en un medio α-MEM que contenía 10% de FBS y 10 ng/ml de M-CSF (fabricado por R&D Systems, Inc.), la preparación de

células resultante se sembró en cada pozo de una placa de 96 pozos en una cantidad de 200 μl y las células se cultivaron durante 2 días en una incubadora de CO_2. La solución de cultivo vieja en la placa de 96 pozos fue removida, y 100 μl de medio MEM-α se añadió a cada pozo, los 100 μl de medio MEM-α que contenía 10% de FBS al cual se había añadido RANKL humano (RANKL, fabricado por Peprotech, Inc.) y M-CSF para dar concentraciones finales de 20 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente. A la solución de cultivo de células, el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) preparado en el ejemplo 6 o cada uno de los 6 tipos de anticuerpo humanizado #32A1s (h#32A1-T1, h#32A1-T2, h#32A1-T3, h#32A1-T4, h#32A1-T5 y h#32A1-T6) preparados en el ejemplo 24 se añadió a una concentración de 3 a 100 ng/ml, y las células se cultivaron durante 3 días adicionales en una incubadora de CO_2. Después de completarse el cultivo, la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos formados se midió por el siguiente procedimiento. La solución de cultivo en cada pozo de la placa de 96 pozos fue removida por succión, y 50 μl de 50 mM de citrato de sodio regulador de pH (pH 6.1) que contenía 1% de Triton X-100 se añadió a cada pozo. Después, la placa se agitó durante 5 minutos sobre un agitador de placa para lisar las células. A cada pozo, 50 μl de a solución de sustrato (50 mM citrato de sodio regulador de pH (pH 6.1) que contenía 5 mg/ml de p-nitrofenil fosfato y 0.46% de tartrato de sodio) se añadieron, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de la incubación, 50 μl de una solución 1 N de hidróxido de sodio se añadió a cada pozo de la placa de 96 pozos para detener la reacción enzimática. Después de detener la reacción enzimática, se midió una absorbancia de cada pozo a 405 nm, y la medición obtenida se usó como un índice de actividad de TRAP. Los resultados se muestran en las figuras 44 y 45. Además, para el anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) preparado en el ejemplo 6, el anticuerpo

quimérico humano del anticuerpo #32A1 preparado en el ejemplo 19, y 4 tipos de anticuerpo humanizado #32A1s (h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L2-16, y h#32A1-H1-1/L2-15) preparado en el ejemplo 28, la actividad biológica fue evaluada por el mismo método que en esta prueba, y los resultados se muestran en las figuras 46 y 47. En todos los casos de los 10 tipos de anticuerpo humanizado #32A1s (h#32A1-T1, h#32A1-T2, h#32A1-T3, h#32A1-T4, h#32A1-T5, h#32A1-T6, h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L2-16, y h#32A1-H1-1/L2-15) para los cuales se evaluó la actividad, se observó una fuerte actividad de inhibir la formación de osteoclastos sustancialmente comparable con la del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) o el anticuerpo quimérico humano del anticuerpo #32A1.

EJEMPLO 30

Efecto de la adición de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 sobre la resorción de hueso actividad de células precursoras de osteoclastos humanos normales (evaluación que usó placa revestida con colágeno)

Células precursoras de osteoclastos humanas normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) se sembraron en una placa de cultivo OsteoLyse de 96 pozos (comprada de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PA-1500) a 1 x 10^4 células/pozo de conformidad con el protocolo que acompaña las células. Como el medio, se usó un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, compradas de Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) complementados con un conjunto de complemento de OPGM (comprado con Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) que contenía suero de bovino fetal

(concentración final: 10%), RANKL humano (concentración final: 63.8 ng/ml), M-CSF (concentración final humana: 33 ng/ml), y similares. Al sobrenadante de cultivo resultante, cada uno del anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata (anticuerpo #32A1) preparado en el ejemplo 6, el anticuerpo quimérico humano del anticuerpo #32A1 preparado en el ejemplo 19, y los 10 tipos de anticuerpo humanizado #32A1s (h#32A1-T1, h#32A1-T2, h#32A1-T3, h#32A1-T4, h#32A1-T5, h#32A1-T6, h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L2-16, y h#32A1-H1-1/L2-15) preparados en los ejemplos 24 y 28 se añadió a una concentración final de 4, 20, 100 ó 500 ng/ml, y las células se cultivaron durante 5 días en una incubadora de CO_2. Una alícuota de 10 μl del sobrenadante de cultivo fue recolectada, 200 μl de reactivo de liberación de fluoróforo incluido en el OsteoLyse Assay Kit se añadió a la misma, y mediante el uso de un lector de placa de fluorescencia (ARVO MX, fabricado por Perkin Elmer Inc.), fluorometría resuelta en el tiempo (fluorómetro de fluorescencia resuelta en el tiempo) (Excitación: 340 nm, Emisión: 615 nm) adecuado para medición de fluorescencia usando europio se realizó, por lo que la cantidad de fragmentos libres de colágeno fluorescente liberado en el sobrenadante de cultivo se determinó (figuras 48 y 49). Como resultado, la cantidad de fragmentos de colágeno fluorescente incrementado mediante la adición de RANKL fue reducido mediante la adición del anticuerpo #32A1 de rata o el anticuerpo quimérico humano #32A1 de una manera dependiente de la concentración. De la misma manera, también por todos los 10 tipos de anticuerpo humanizado #32A1 examinados, se observó una inhibición dependiente de la concentración. A partir de este resultado, se reveló que la actividad de resorción de hueso de osteoclastos humanos es inhibida por los anticuerpos humanizados #32A1 específicamente la unión a la proteína Siglec-15.

EJEMPLO 31

Evaluación biológica de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 usando ratas ovariectomizadas

Un efecto inhibidor sobre una disminución en la densidad de minerales en hueso en ratas ovariectomizadas presentado por el anticuerpo humanizado obtenido en los ejemplos 24 y 28 puede ser evaluado por el método descrito en el ejemplo 15.

EJEMPLO 32

Evaluación de actividad biológica de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal anti-ratón Siglec-15 de rata #32A1 basado en prueba para la formación de osteoclastos de ratón por estimulación con el FNTα

Un efecto inhibidor sobre la formación de osteoclastos de ratón por estimulación con FNTα presentada por los anticuerpos humanizados obtenidos en los ejemplos 24 y 28 pueden ser evaluados por el método descrito en el ejemplo 26.

EJEMPLO 33

Determinación de estabilidad térmica de anticuerpo humanizado usando calorimetría de escudriñamiento diferencial (DSC)

Para h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H1-1/L2-15, y h#32A1-H1-1/L2-16, se determinó la estabilidad térmica. Cada una de las muestras se preparó a una concentración de 0.5 mg/ml (en una solución de CBS), y una alícuota de 400 μl de la misma se usó como una solución de muestra para la medición de DSC. Las condiciones para la medición de DSC se fijaron como

sigue. Es decir, la temperatura inicial se fijó a 20°C, la temperatura final se fijó a 100°C, la velocidad de incremento de temperatura se fijó a 60°C/hora, y el tiempo en el filtro se fijó a 10 segundos. Como una solución de referencia, se usó CBS. Como un instrumento para la medición de DSC se usó la plataforma, VP-Capillary DSC fabricada por MicroCal Inc. E.U.A. La línea basal (una curva de escudriñamiento obtenida al llenar la solución de referencia también en una celda de muestras) se sustrajo de una curva de escudriñamiento obtenida para cada solución de muestra, por lo que se realizó la corrección de línea basal. La figura 50 muestra un termograma para h#32A1-H5/L5, la figura 51 muestra un termograma para h#32A1-H1-1/L5, la figura 52 muestra un termograma para h#32A1-H1-1/L2-15, y la figura 53 muestra un termograma para h#32A1-H1-1/L2-16. Cuando un valor superior pico en cada termograma se tomó como una temperatura de punto medio de desnaturalización térmica (Tm) en la región Fab, el valor de Tm de h#32A1-H5/L5 fue 81.2°C, el valor de Tm de h#32A1-H1-1/L5 fue 84.1°C, el valor de Tm de h#32A1-H1-1/L2-15 fue 80.0°C, y el valor de Tm de h#32A1-H1-1/L2-16 (IgG2) fue 77.9°C.

Aplicabilidad industrial

El anticuerpo anti-Siglec-15 quimérico o humanizado de la invención tiene una capacidad para inhibir la diferenciación de osteoclastos o actividad de resorción de hueso, y una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 puede ser un agente terapéutico o preventivo para una enfermedad del metabolismo anormal de hueso.

Número de acceso

FERM BP-10999

REIVINDICACIONES

1.- Un polinucleótido que codifica un anticuerpo quimérico, o un fragmento funcional del mismo, el cual se une a un polipéptido que comprende residuos de aminoácidos 39 a 165 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 e inhibe la formación de osteoclastos y/o resorción osteoclástica de hueso, o un fragmento funcional del anticuerpo, caracterizada porque contiene:

una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 40, y

una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 396 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 42.

2.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque contiene una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 40 y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 711 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 42.

3.- Un polinucleótido que codifica un anticuerpo humanizado que inhibe la formación de osteoclastos y/o resorción osteoclástica de hueso, o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el polinucleótido es seleccionado de:

(a) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 50, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 60;

(b) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420

de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 52, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 62;

(c) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 64;

(d) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 396 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 66;

(e) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 56, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68;

(f) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 58, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 70;

(g) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada

por SEQ ID NO: 68;

(h) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68;

(i) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 102;

(j) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 104;

(k) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 50, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 60;

(l) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 52, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 62;

(m) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada

codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 64;

(n) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 711 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 66;

(o) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 56, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68;

(p) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 58, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 70;

(q) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68;

(r) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos

que comprende nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68;

(s) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 102; y

(t) un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 104.

4.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 50, y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 60.

5.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 52, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 62.

6.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos

representada por SEQ ID NO: 54, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 64.

7.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 396 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 66.

8.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 56, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

9.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 58, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 70.

10.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera

codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

11.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

12.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 102.

13.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 420 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 399 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 104.

14.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 50, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que

comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 60.

15.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 52, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 62.

16.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 64.

17.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 54, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 711 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 66.

18.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 56, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos

representada por SEQ ID NO: 68.

19.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1410 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 58, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 70.

20.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 13980 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

21.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 68.

22.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 102.

23.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque contiene un polinucleótido que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1398 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 98, y una región variable de la cadena ligera codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 714 de una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 104.

24.- Un vector, que comprende cualquiera de los polinucleótidos de conformidad con las reivindicaciones 1 a 23.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se provee una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir el metabolismo anormal de hueso que dirige una proteína codificada por un gen fuertemente expresado en osteoclastos;.de manera específica, se prevé una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo que reconoce específicamente Siglec-15 humana y tiene una actividad de inhibir la formación de osteoclastos, y similares.

Figura 1

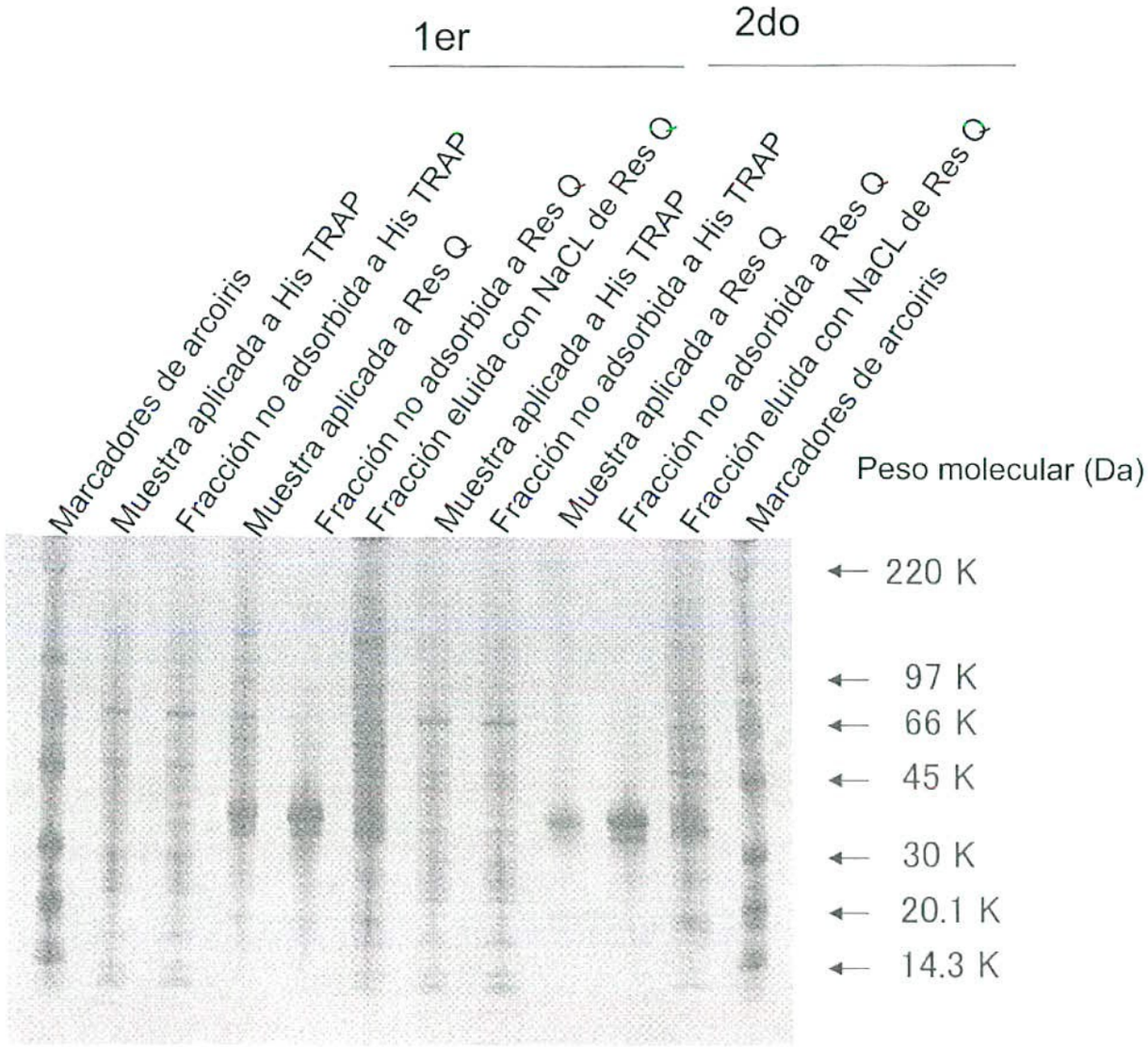

1er
2do
Marcadores de arcoiris
Muestra aplicada a His TRAP
Fracción no adsorbida a His TRAP
Muestra aplicada a Res Q
Fracción no adsorbida a Res Q
Fracción eluida con NaCL de Res Q
Muestra aplicada a His TRAP
Fracción no adsorbida a His TRAP
Muestra aplicada a Res Q
Fracción no adsorbida a Res Q
Fracción eluida con NaCL de Res Q
Marcadores de arcoiris
Peso molecular (Da)
220 K
97 K
66 K
45 K
30 K
20.1 K
14.3 K

Figura 2

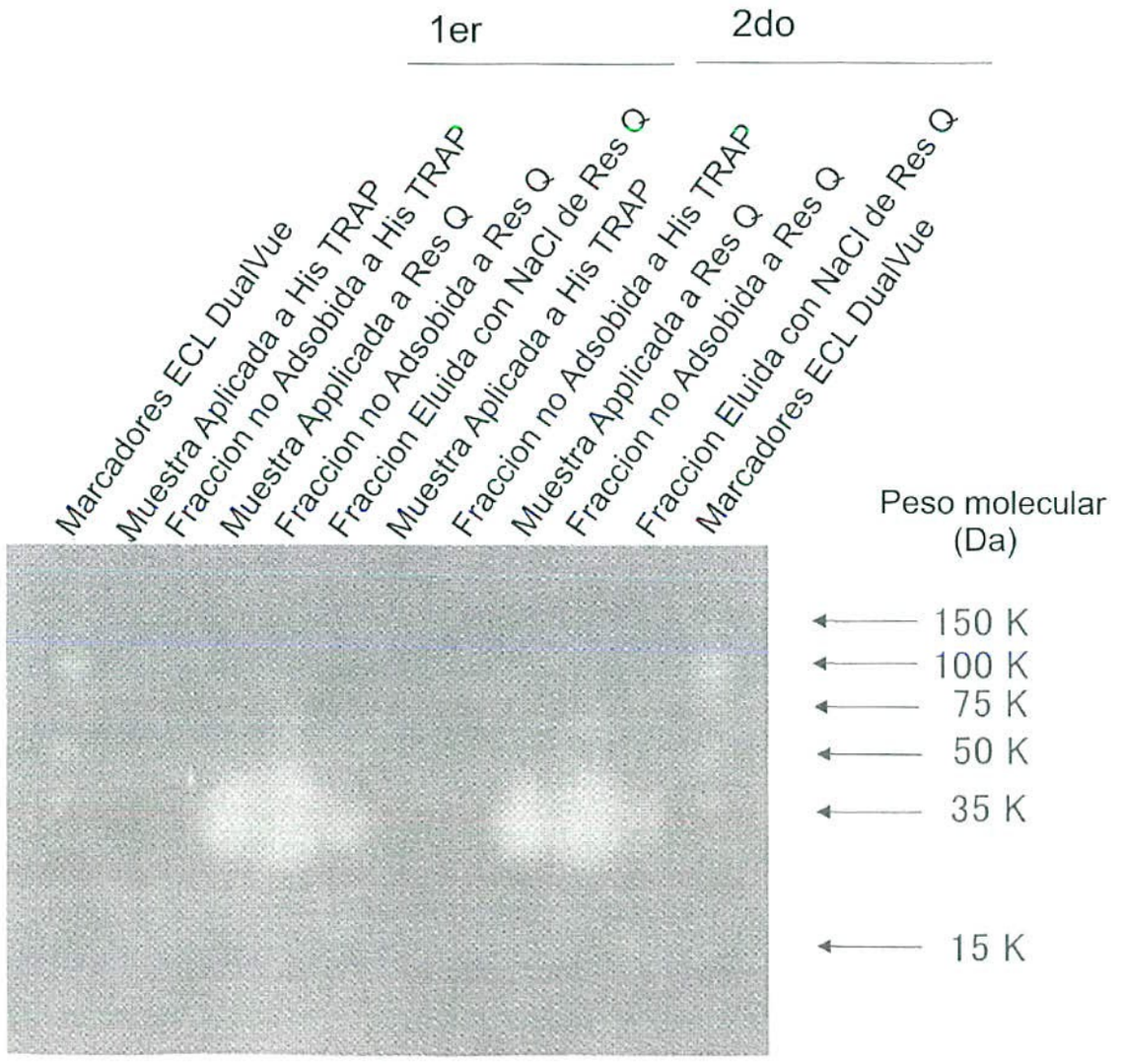

1er
2do
Marcadores ECL DualVue
Muestra Aplicada a His TRAP
Fraccion no Adsobida a His TRAP
Muestra Applicada a Res Q
Fraccion no Adsobida a Res Q
Fraccion Eluida con NaCl de Res Q
Muestra Aplicada a His TRAP
Fraccion no Adsobida a His TRAP
Muestra Applicada a Res Q
Fraccion no Adsobida a Res Q
Fraccion Eluida con NaCl de Res Q
Marcadores ECL DualVue
Peso molecular (Da)
150 K
100 K
75 K
50 K
35 K
15 K

Figura 3

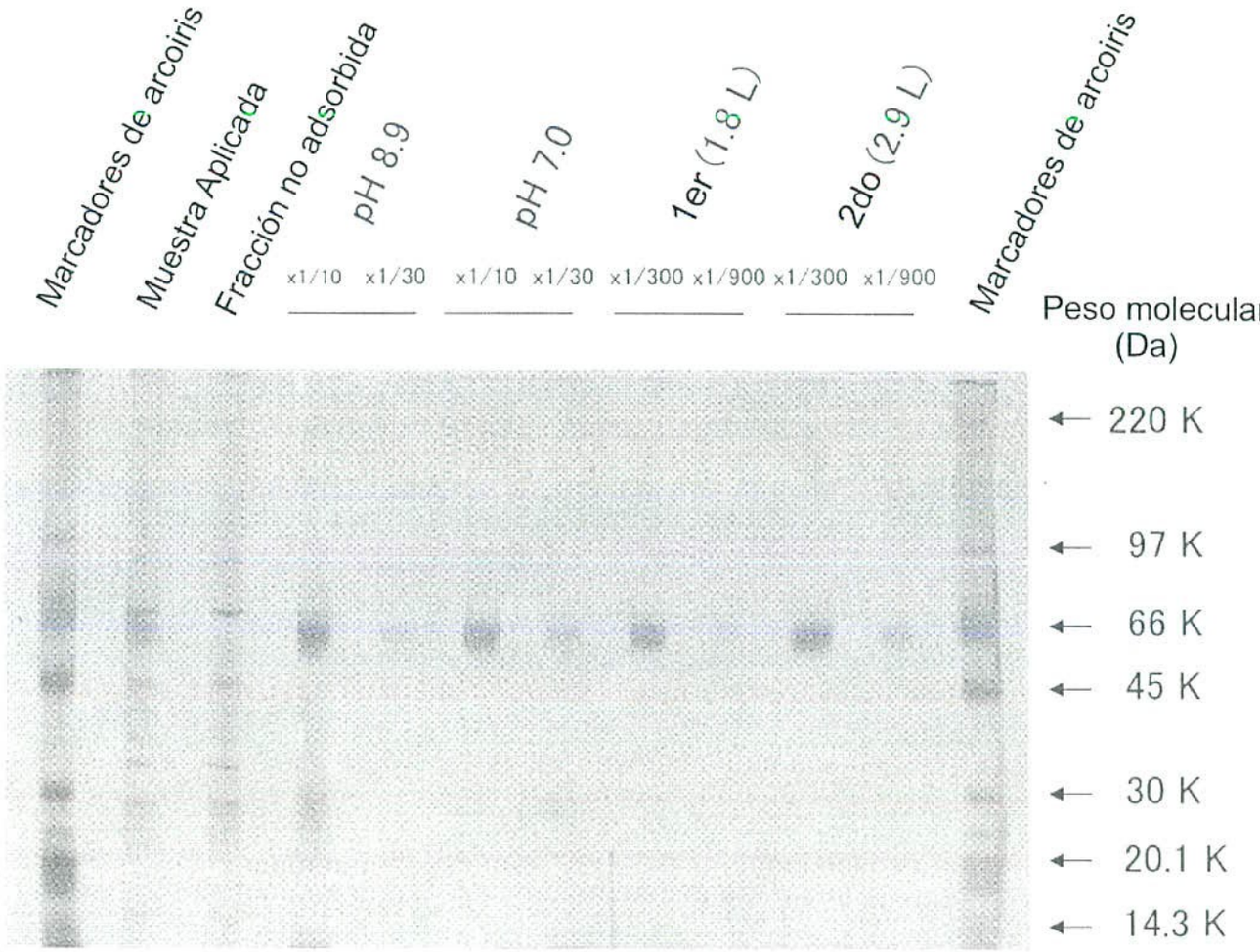

Marcadores de arcoiris
Muestra Aplicada
Fracción no adsorbida
pH 8.9
x1/10
x1/30
pH 7.0
x1/10
x1/30
1er (1.8 L)
x1/300
x1/900
2do (2.9 L)
x1/300
x1/900
Marcadores de arcoiris
Peso molecular (Da)
220 K
97 K
66 K
45 K
30 K
20.1 K
14.3 K

Figura 4

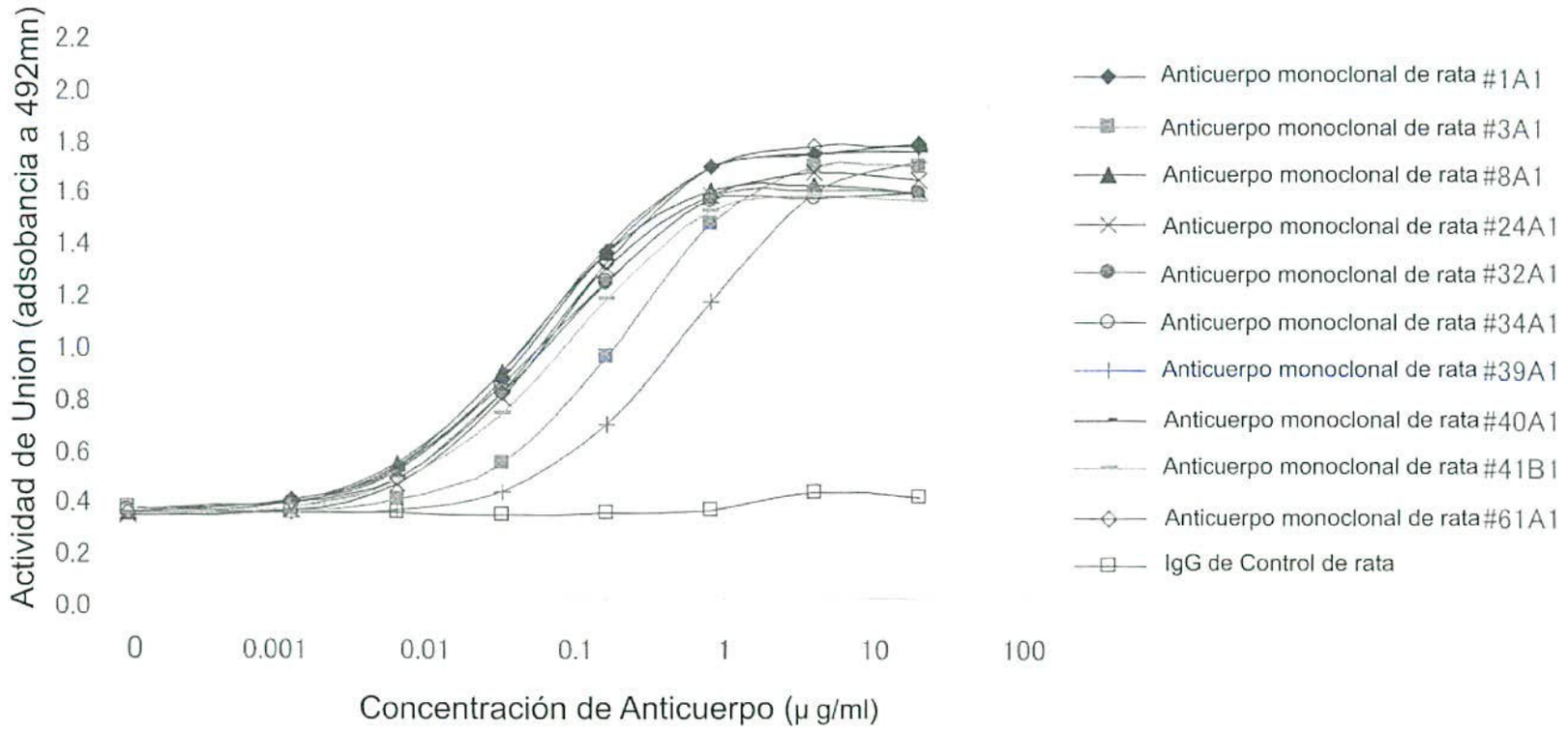

Actividad de Union (adsobancia a 492mn)
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración de Anticuerpo (µ g/ml)
Anticuerpo monoclonal de rata #1A1
Anticuerpo monoclonal de rata #3A1
Anticuerpo monoclonal de rata #8A1
Anticuerpo monoclonal de rata #24A1
Anticuerpo monoclonal de rata #32A1
Anticuerpo monoclonal de rata #34A1
Anticuerpo monoclonal de rata #39A1
Anticuerpo monoclonal de rata #40A1
Anticuerpo monoclonal de rata #41B1
Anticuerpo monoclonal de rata #61A1
IgG de Control de rata

Figura 5

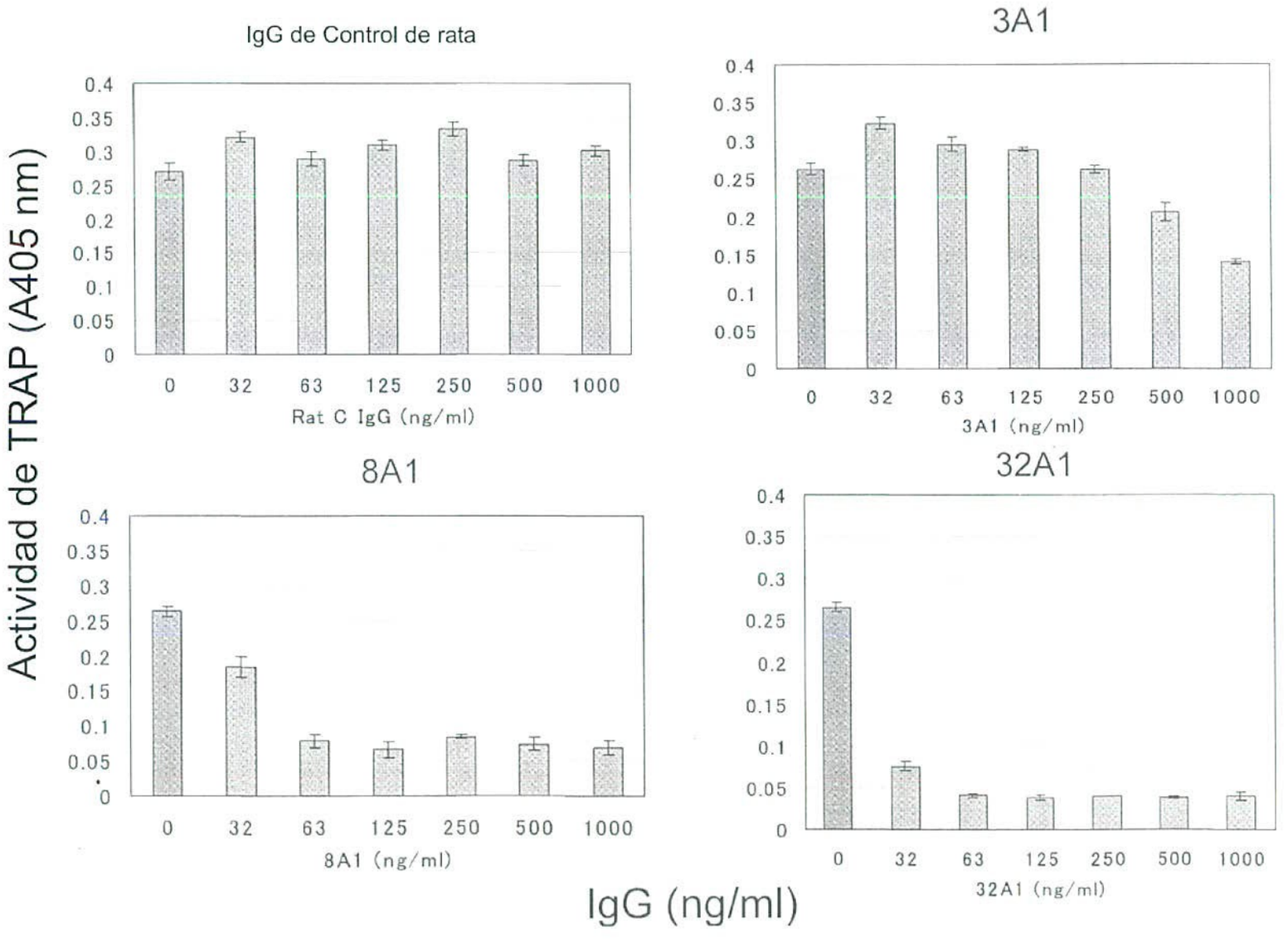

IgG de Control de rata
Rat C IgG (ng/ml)
3A1
3A1 (ng/ml)
8A1
8A1 (ng/ml)
32A1
32A1 (ng/ml)
Actividad de TRAP (A405 nm)
IgG (ng/ml)
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
0.35
0.4
0
32
63
125
250
500
1000

Figura 6

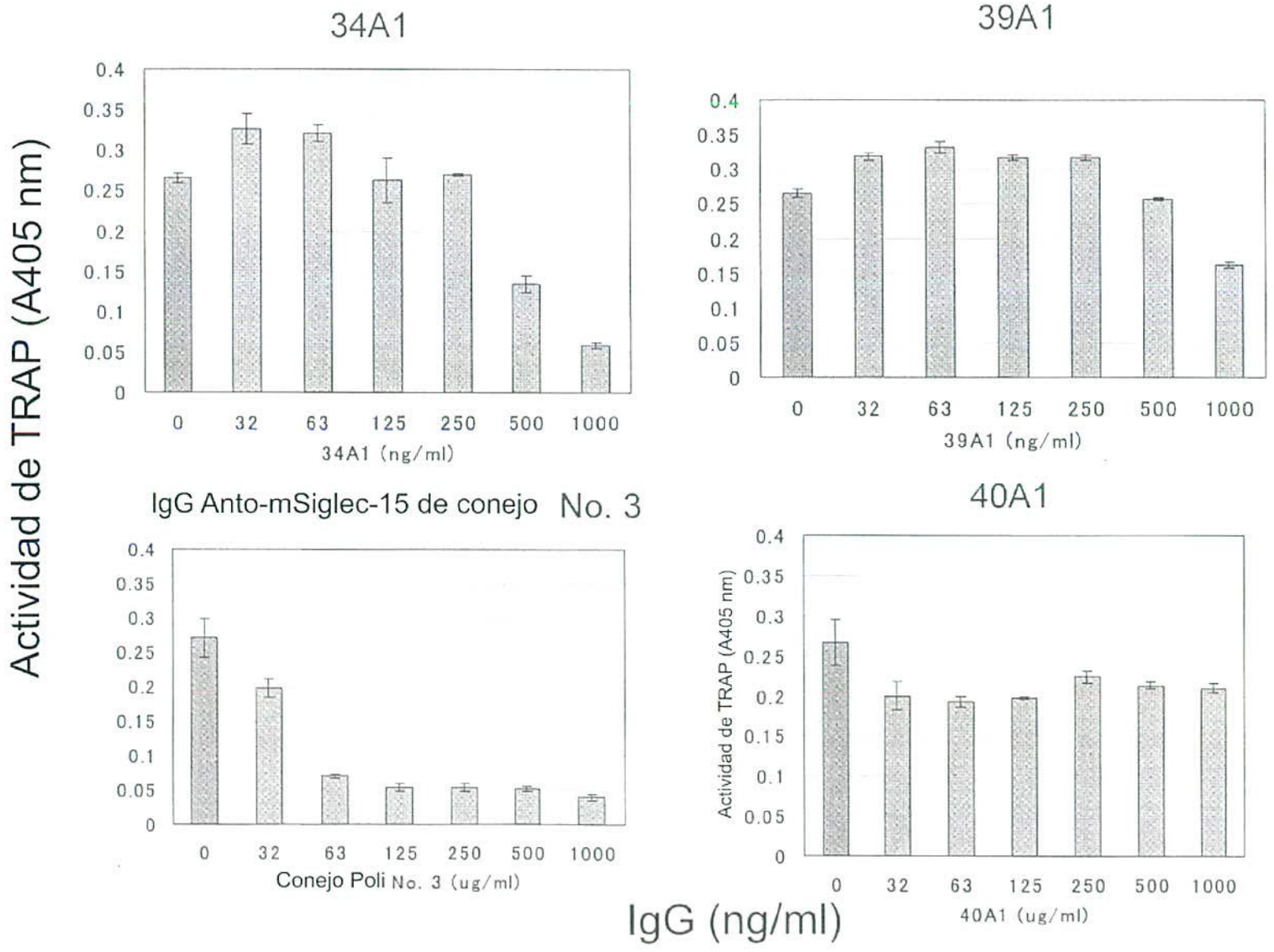

34A1
39A1
40A1
IgG Anto-mSiglec-15 de conejo No. 3
Actividad de TRAP (A405 nm)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0 32 63 125 250 500 1000
34A1 (ng/ml)
39A1 (ng/ml)
Conejo Poli No. 3 (ug/ml)
40A1 (ug/ml)
IgG (ng/ml)

Figura 7

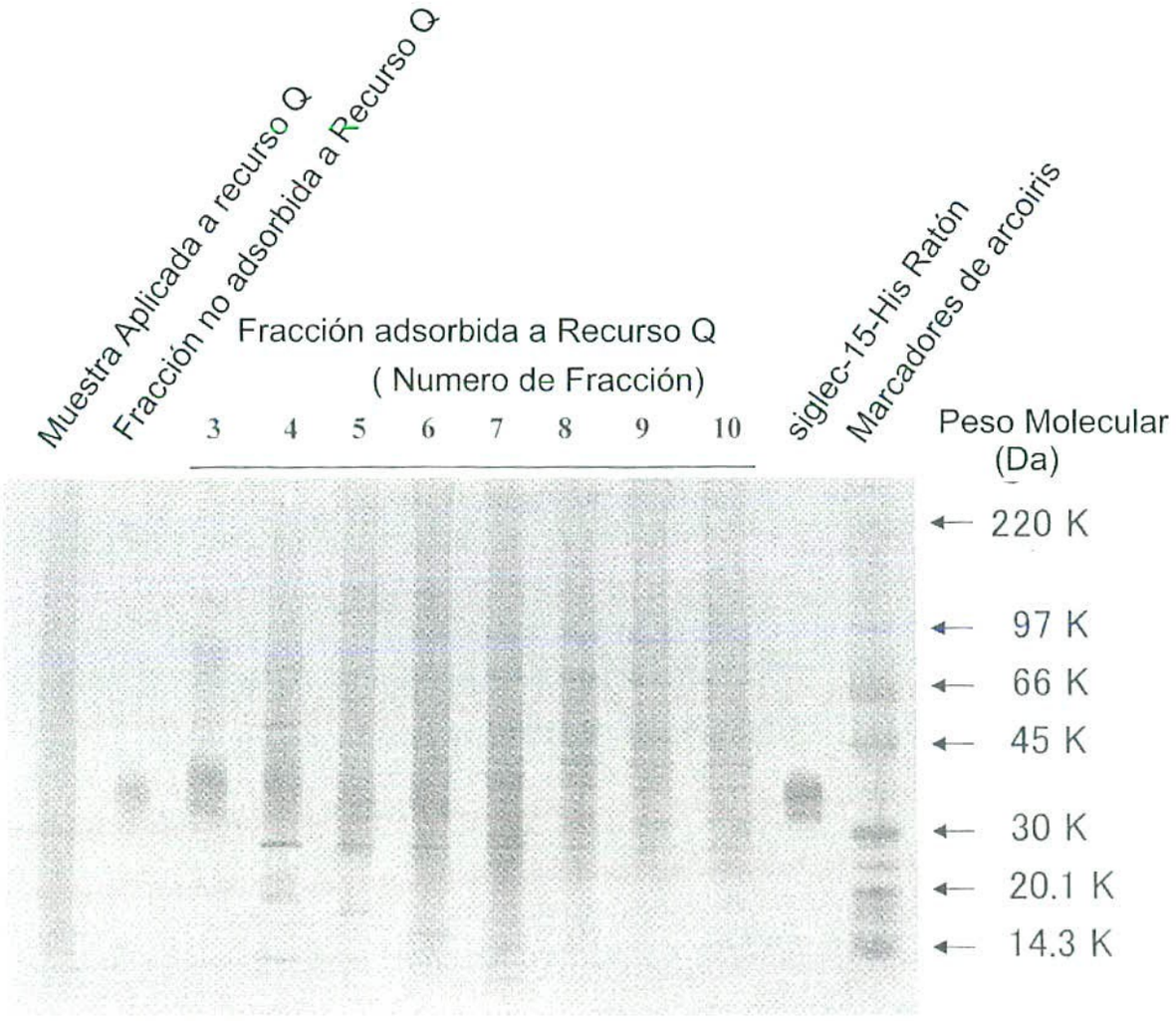

Muestra Aplicada a recurso Q
Fracción no adsorbida a Recurso Q
Fracción adsorbida a Recurso Q
(Numero de Fracción)
3
4
5
6
7
8
9
10
siglec-15-His Ratón
Marcadores de arcoiris
Peso Molecular
(Da)
220 K
97 K
66 K
45 K
30 K
20.1 K
14.3 K

Figura 8

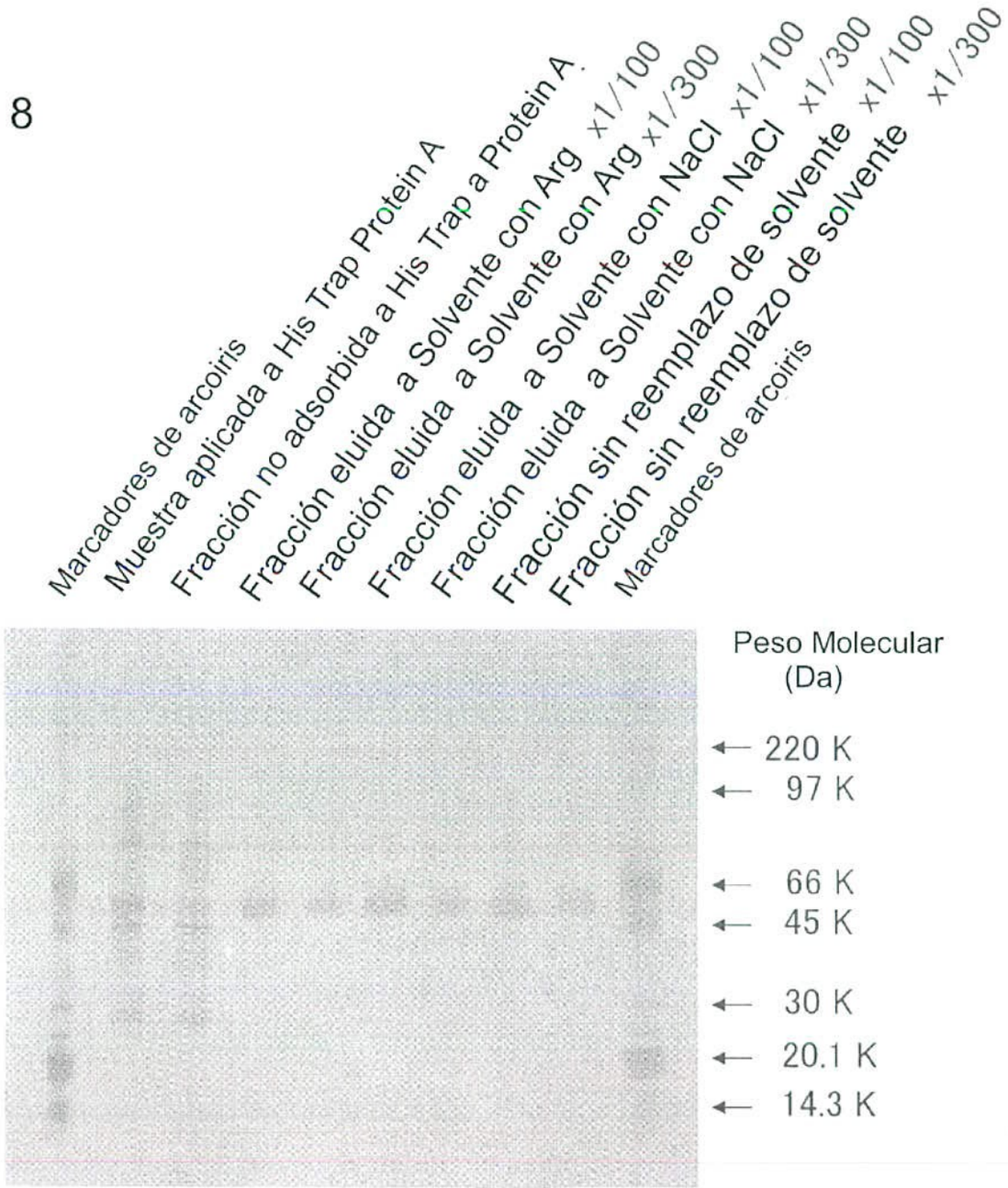

Marcadores de arcoiris
Muestra aplicada a His Trap Protein A
Fracción no adsorbida a His Trap a Protein A
Fracción eluida a Solvente con Arg x1/100
Fracción eluida a Solvente con Arg x1/300
Fracción eluida a Solvente con NaCl x1/100
Fracción eluida a Solvente con NaCl x1/300
Fracción sin reemplazo de solvente x1/100
Fracción sin reemplazo de solvente x1/300
Marcadores de arcoiris
Peso Molecular (Da)
220 K
97 K
66 K
45 K
30 K
20.1 K
14.3 K

Figura 9

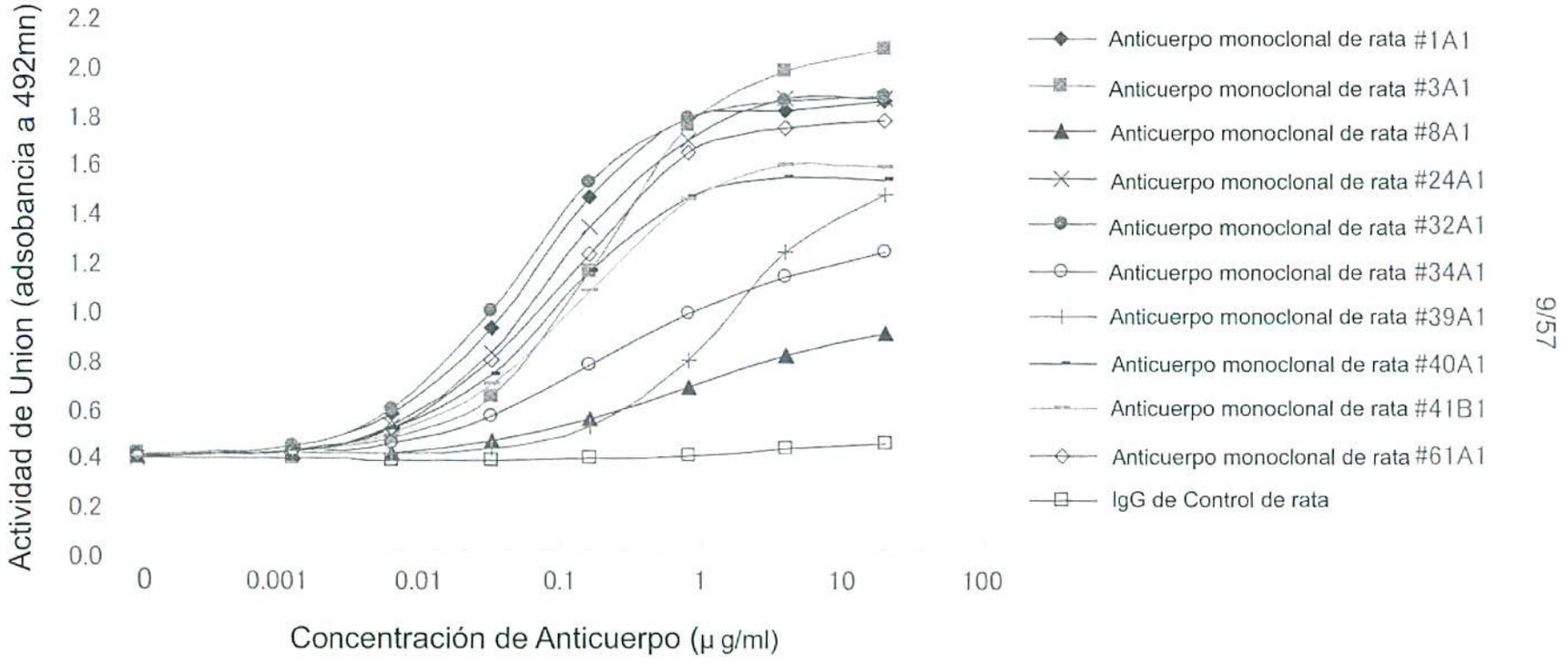
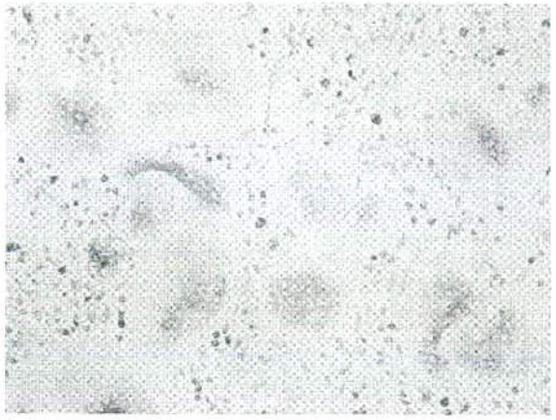
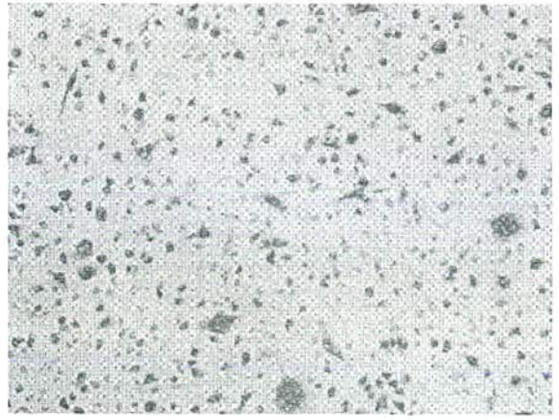

Actividad de Union (adsobancia a 492mn)
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración de Anticuerpo (µ g/ml)
Anticuerpo monoclonal de rata #1A1
Anticuerpo monoclonal de rata #3A1
Anticuerpo monoclonal de rata #8A1
Anticuerpo monoclonal de rata #24A1
Anticuerpo monoclonal de rata #32A1
Anticuerpo monoclonal de rata #34A1
Anticuerpo monoclonal de rata #39A1
Anticuerpo monoclonal de rata #40A1
Anticuerpo monoclonal de rata #41B1
Anticuerpo monoclonal de rata #61A1
IgG de Control de rata

Figura 10

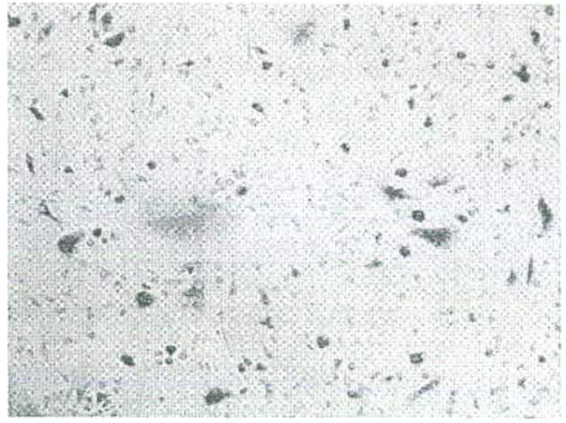
(A) Control



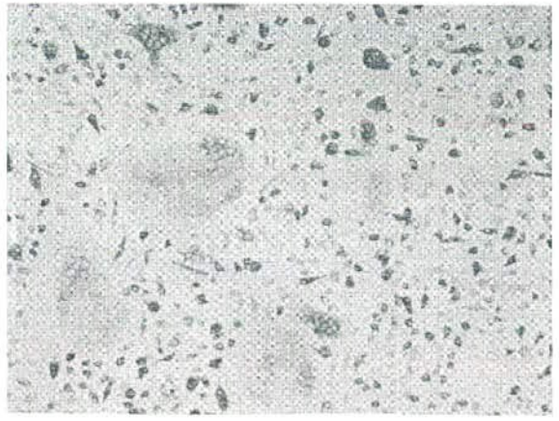
(B) #32A1 Anticuerpo 30 μ g/ml



(C) #41B1 Anticuerpo 30 μ g/ml



(D) #1A1 Anticuerpo 30 μ g/ml



(E) IgG Control 30 μ g/ml

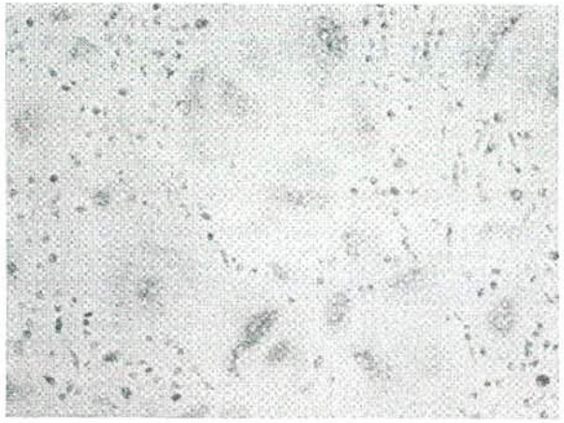
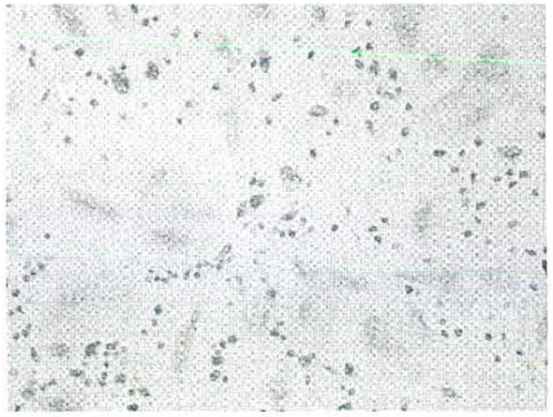
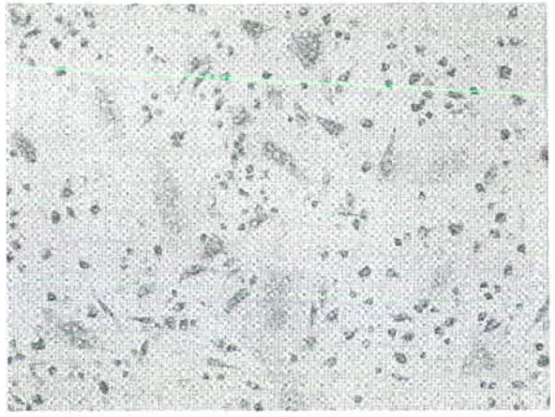


Figura 11

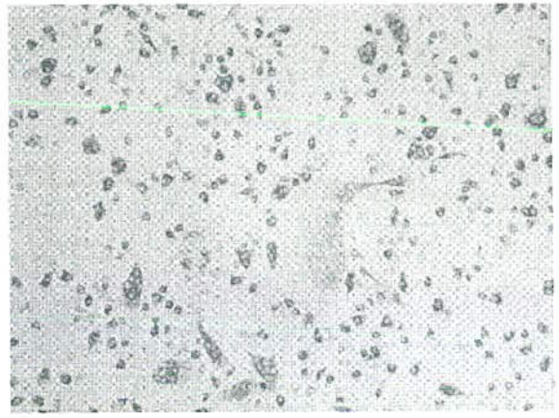
(A) Control



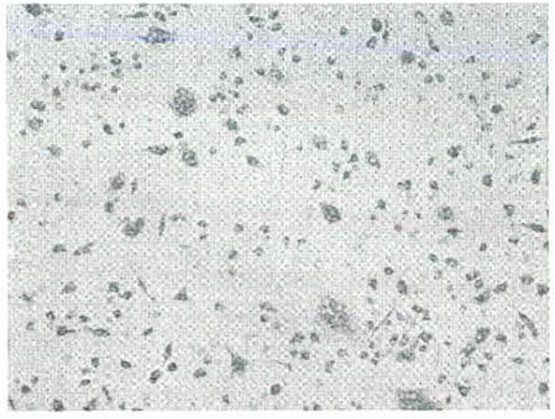
(B) #32A1 Anticuerpo 0.1 μg/ml



(C) #32A1 Anticuerpo 0.3 μg/ml



(D) #32A1 Anticuerpo 1 μg/ml



(E) #32A1 Anticuerpo 3 μg/ml

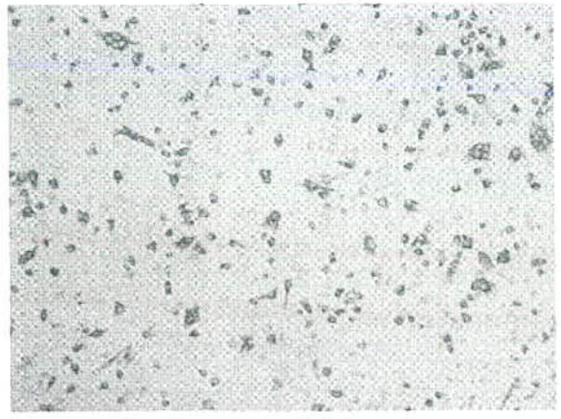


Figura 12

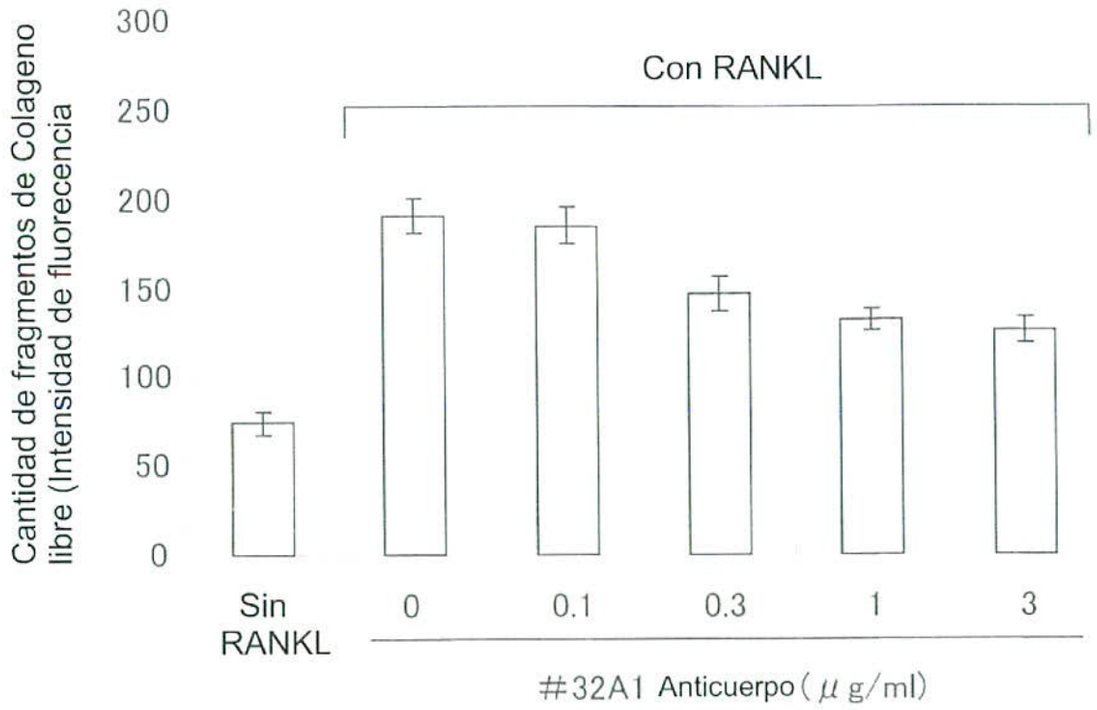

Cantidad de fragmentos de Colageno libre (Intensidad de fluorecencia
300
250
200
150
100
50
0
Con RANKL
Sin RANKL
0
0.1
0.3
1
3
#32A1 Anticuerpo (μ g/ml)

Figura 13

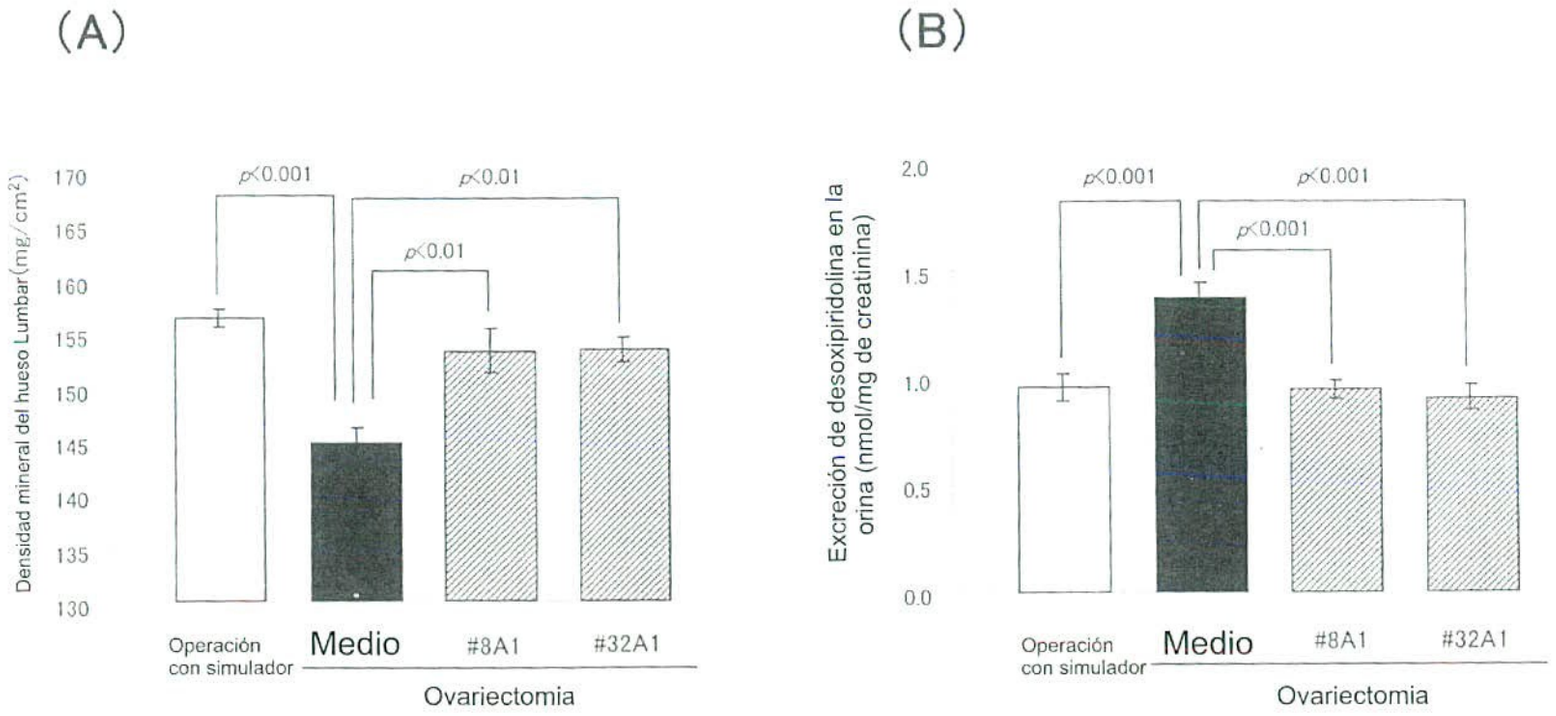

(A)
Densidad mineral del hueso Lumbar(mg/cm²)
170
165
160
155
150
145
140
135
130
p<0.001
p<0.01
p<0.01
Operación con simulador
Medio
#8A1
#32A1
Ovariectomia
(B)
Excreción de desoxipiridolina en la orina (nmol/mg de creatinina)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
p<0.001
p<0.001
p<0.001
Operación con simulador
Medio
#8A1
#32A1
Ovariectomia

Figura 14

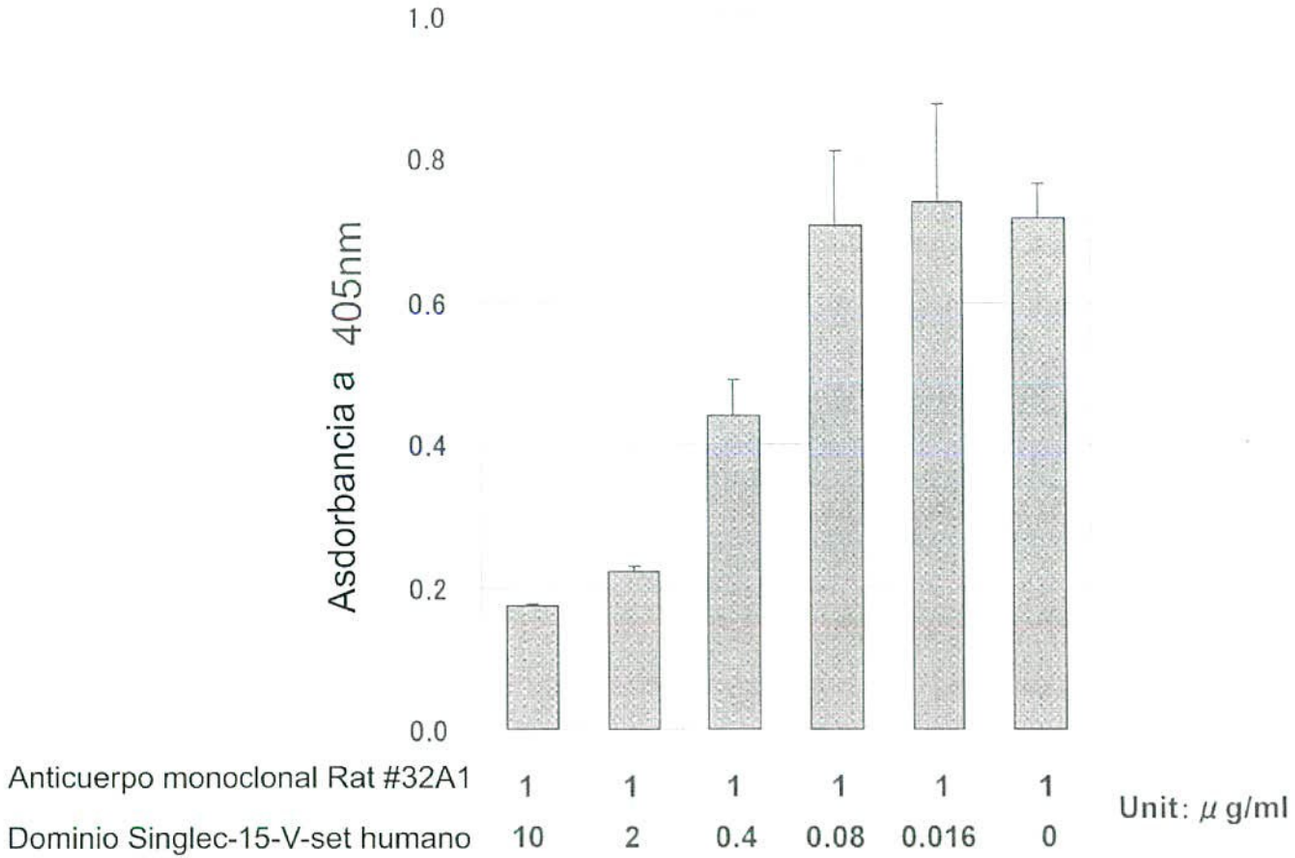

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Asdorbancia a 405nm
Anticuerpo monoclonal Rat #32A1
1 1 1 1 1 1
Dominio Singlec-15-V-set humano
10 2 0.4 0.08 0.016 0
Unit: μg/ml

Figura 15

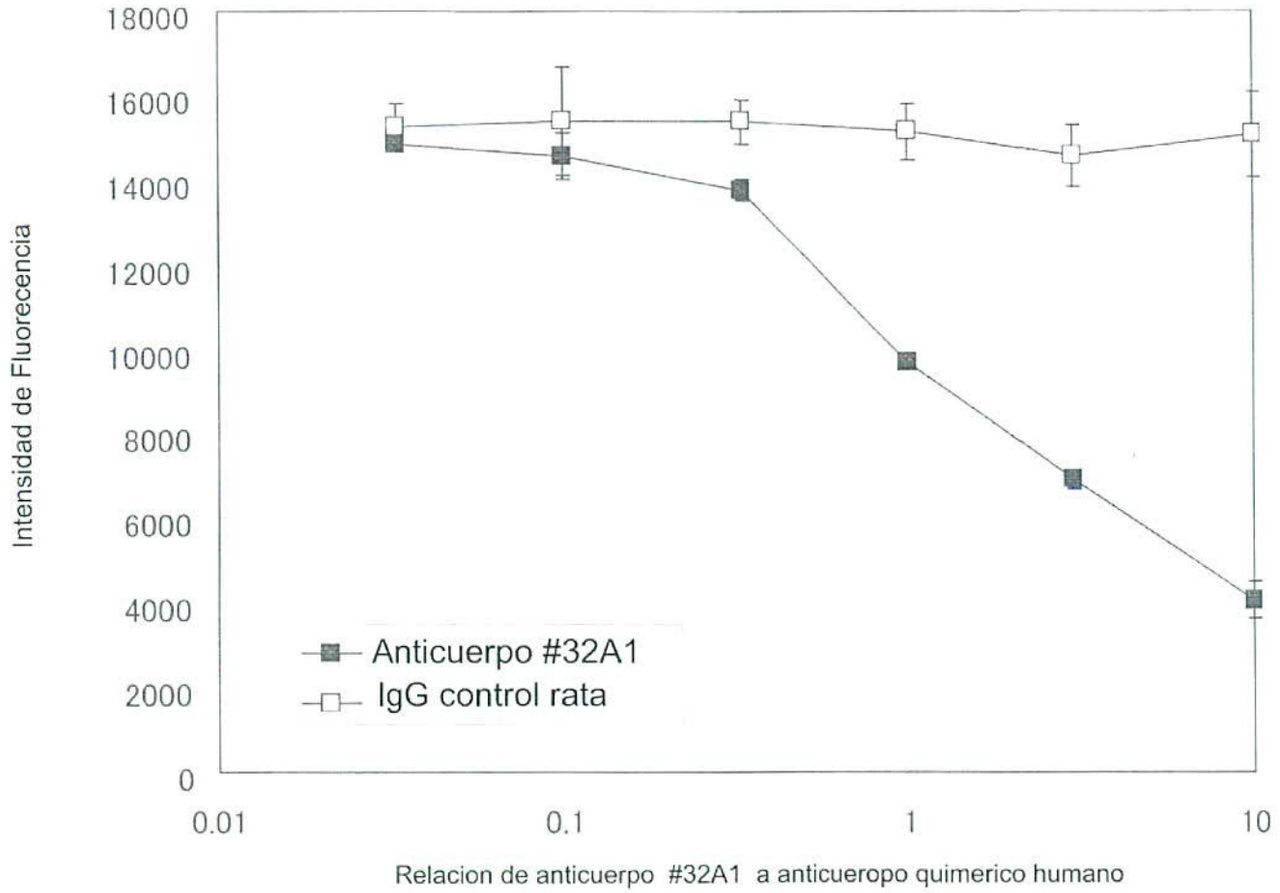

18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Intensidad de Fluorecencia
0.01
0.1
1
10
Relacion de anticuerpo #32A1 a anticueropo quimerico humano
Anticuerpo #32A1
IgG control rata

Figura 16

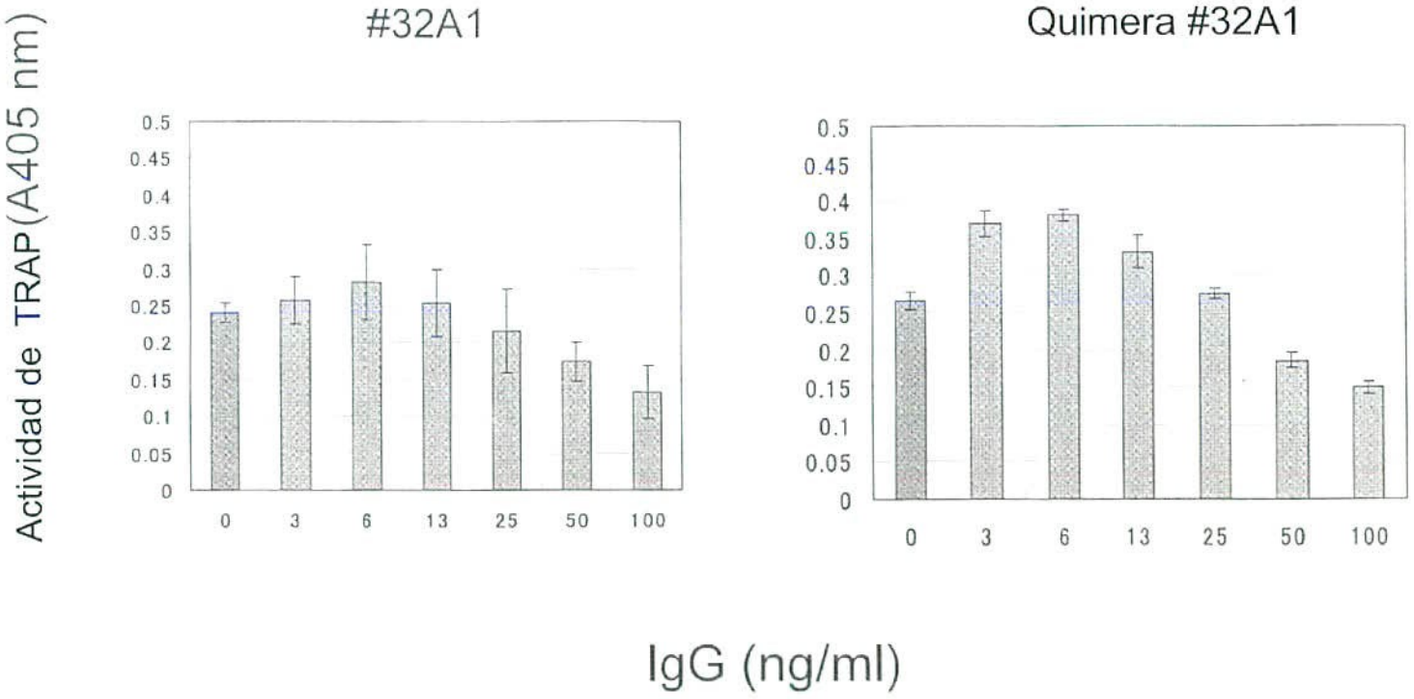
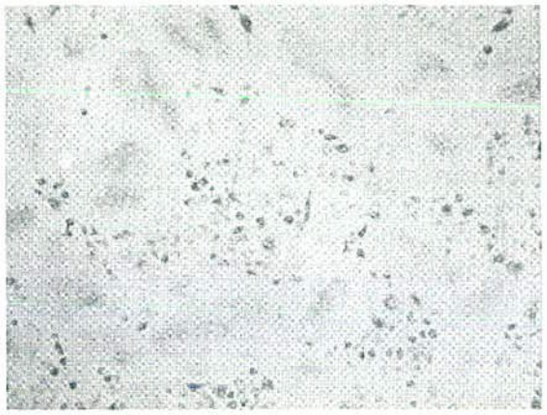

#32A1
Quimera #32A1
Actividad de TRAP (A405 nm)
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0 3 6 13 25 50 100
IgG (ng/ml)

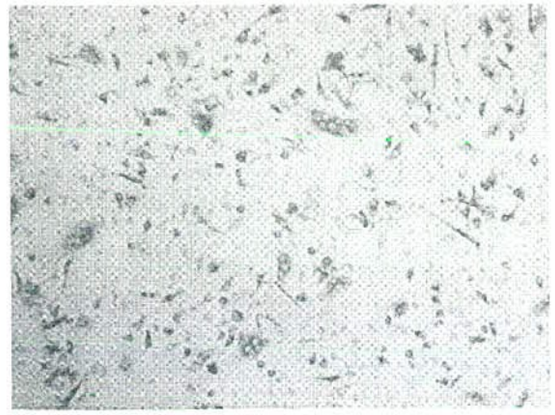
Figura 17

(A) Control

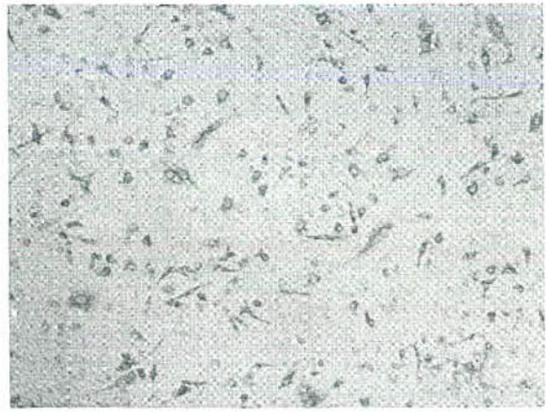


(B) Anticuerpo quimercio humano
0.3 μ g/ml

(C) Anticuerpo quimercio humano
1 μ g/ml



(D) Anticuerpo quimercio humano
3 μ g/ml



(E) Anticuerpo quimercio humano
10 μ g/ml

Figura 18

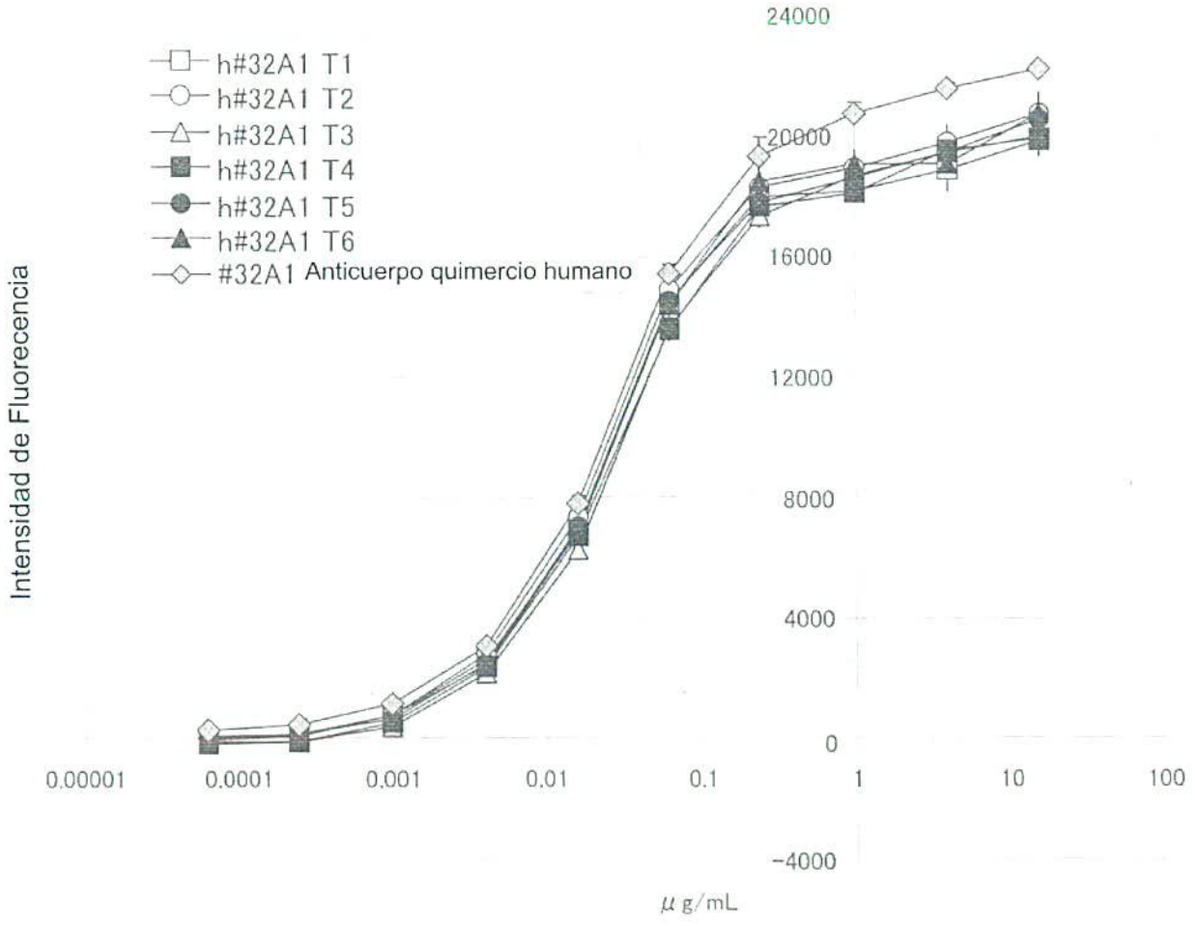

h#32A1 T1
h#32A1 T2
h#32A1 T3
h#32A1 T4
h#32A1 T5
h#32A1 T6
#32A1 Anticuerpo quimercio humano
Intensidad de Fluorecencia
24000
20000
16000
12000
8000
4000
0
-4000
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
μg/mL

Figura 19

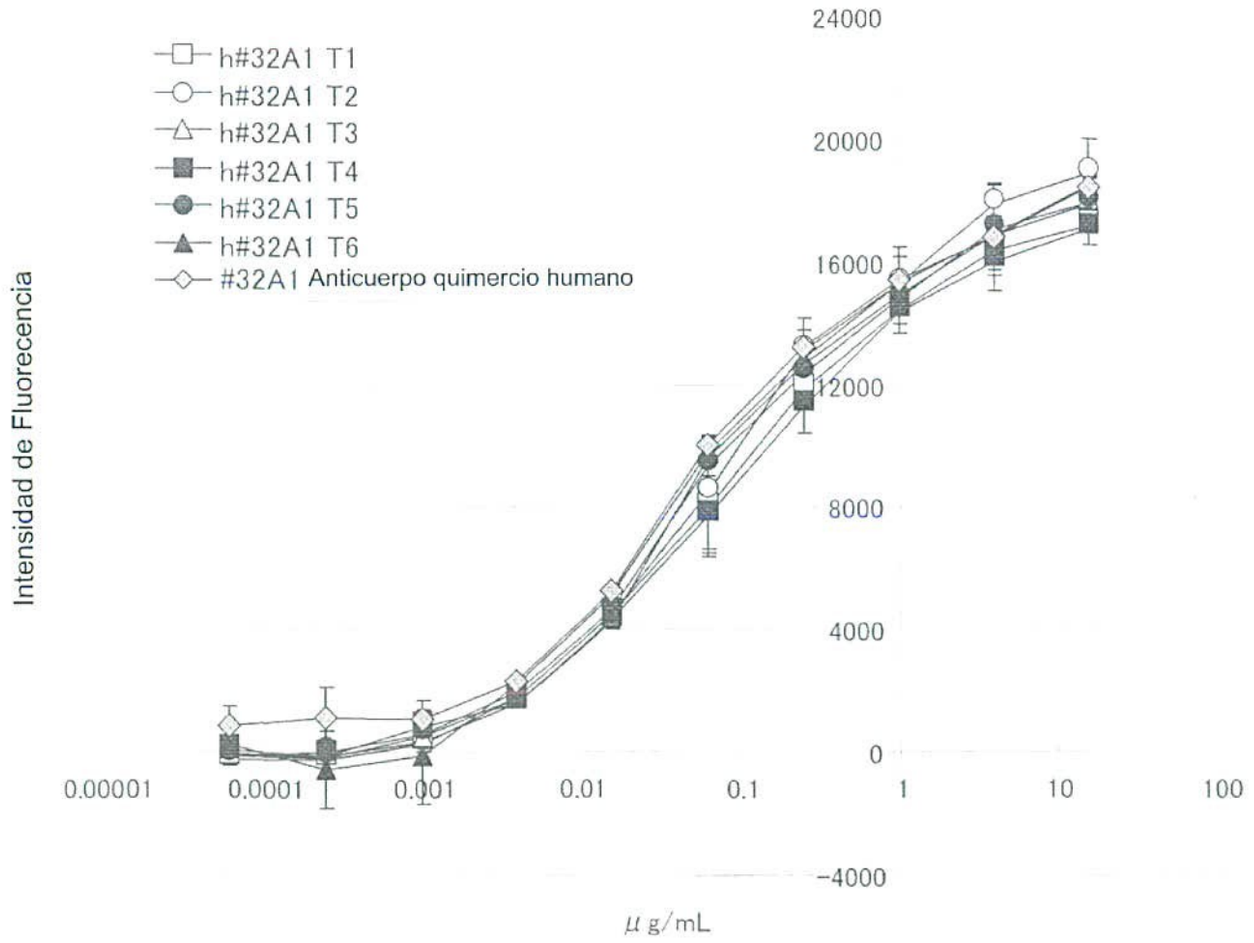
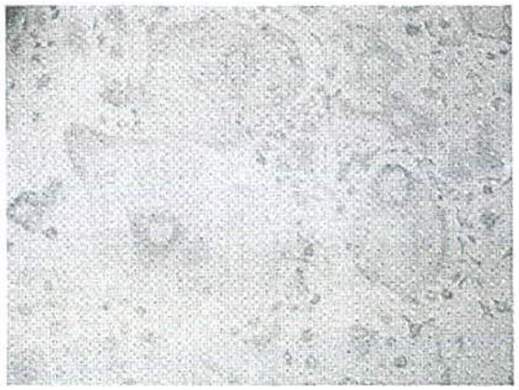
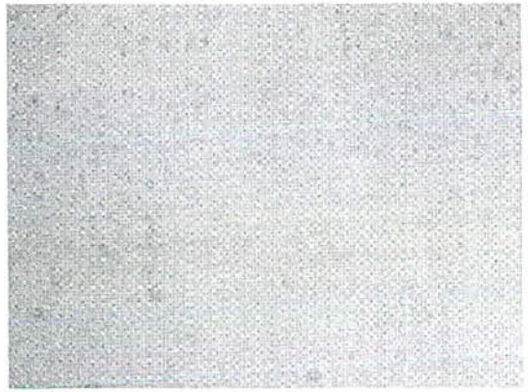

h#32A1 T1
h#32A1 T2
h#32A1 T3
h#32A1 T4
h#32A1 T5
h#32A1 T6
#32A1 Anticuerpo quimercio humano
Intensidad de Fluorecencia
24000
20000
16000
12000
8000
4000
0
-4000
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
μg/mL

Figura 20

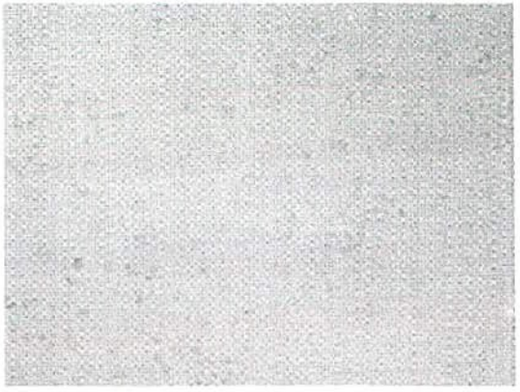
(A) Control: 30 ng/ml TNF α



(B) TNF α + 1 μ g/ml #32A1



(C) TNF α + 1 μ g/ml quimera #32A1



(D) TNF α + 100 ng/ml OCIF/OPG

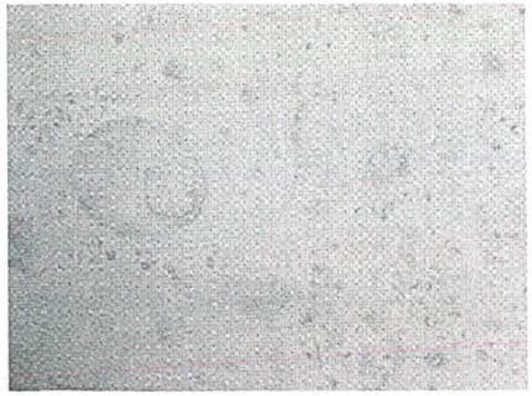


Figura 21

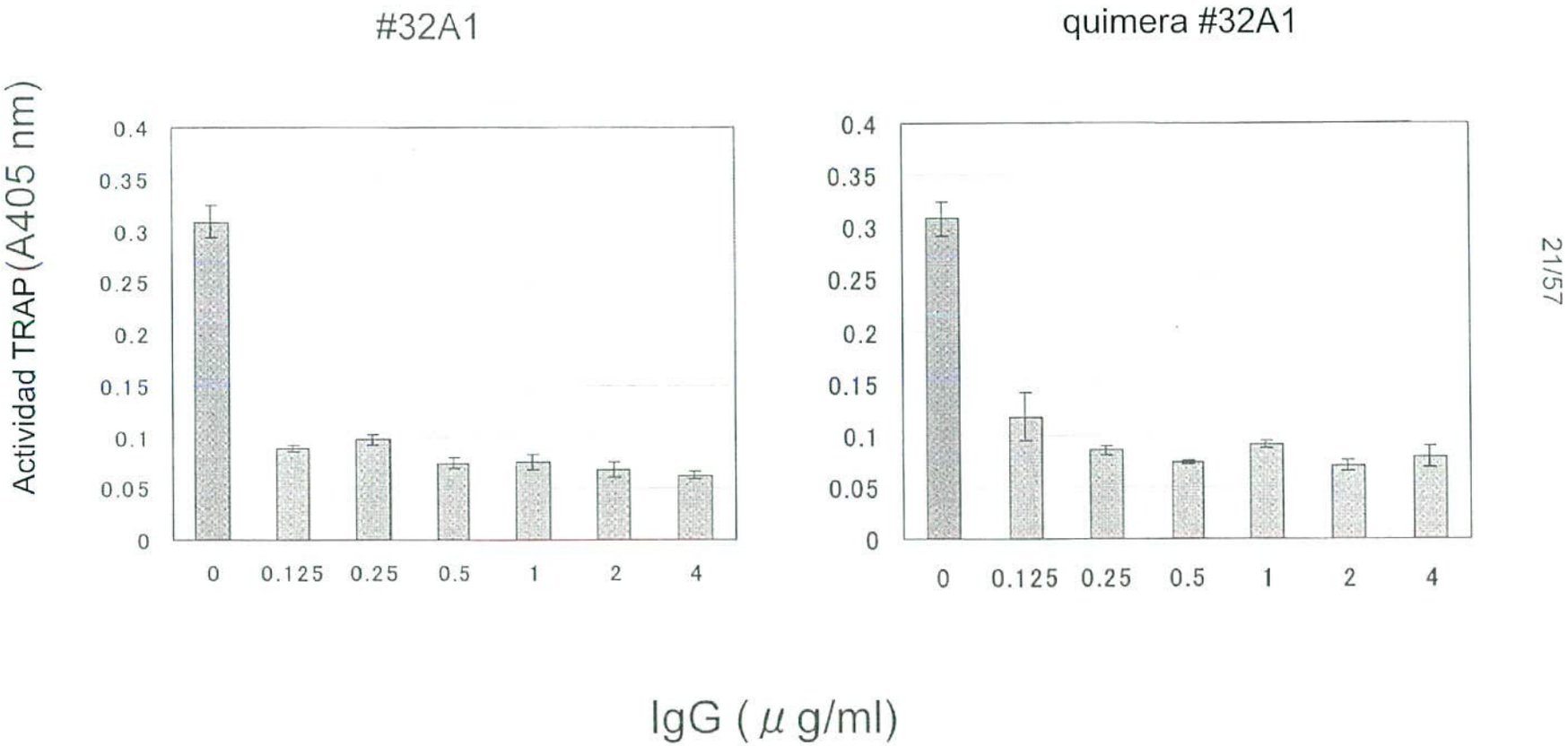

#32A1
quimera #32A1
Actividad TRAP (A405 nm)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0
0.125
0.25
0.5
1
2
4
IgG (μg/ml)

Figura 22

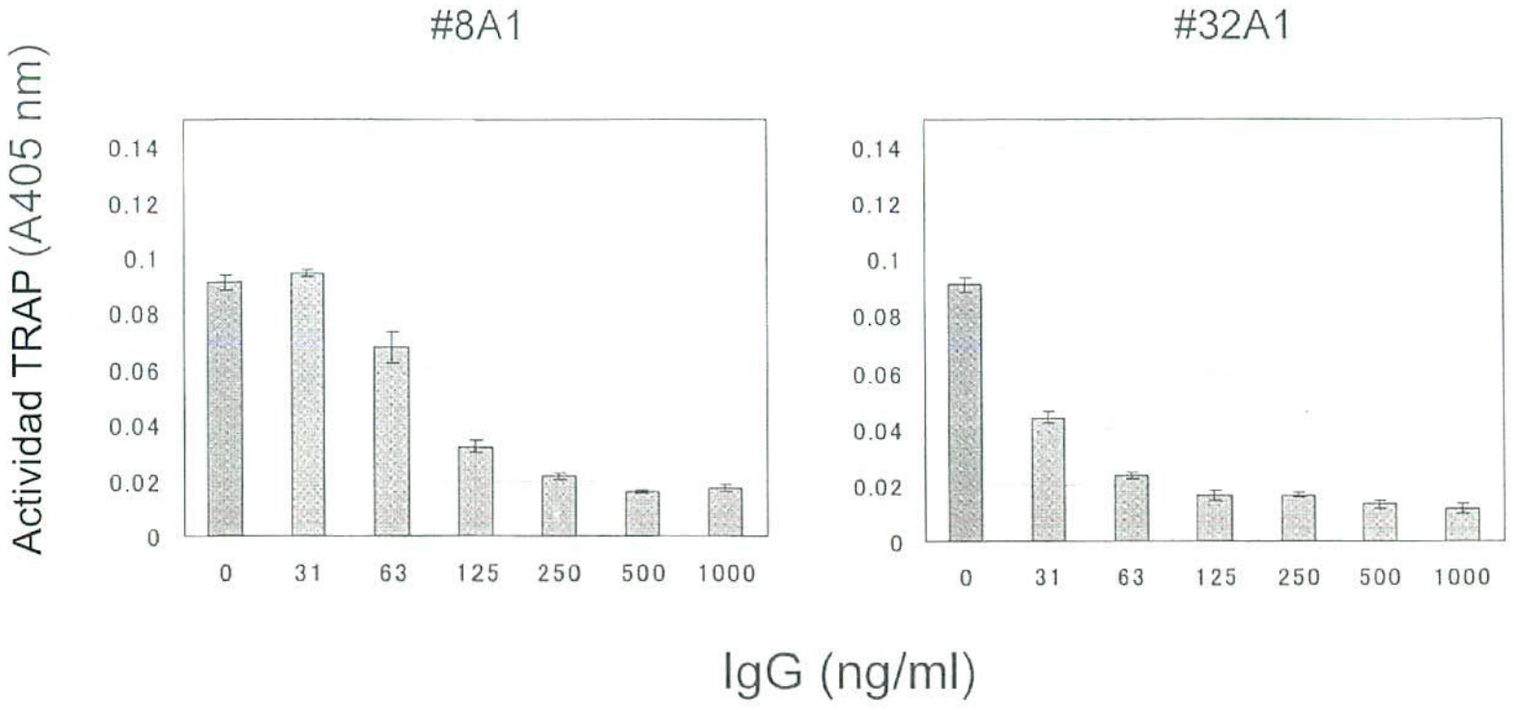

#8A1
#32A1
Actividad TRAP (A405 nm)
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
31
63
125
250
500
1000
IgG (ng/ml)

Figura 23

SEQ. ID NO:27: Secuencia de Nucleótidos clonada de cadena pesada #32A1 de rata (región variable + alfa)

ATGAAGTTGTGGTTGAGCTGGATATTCCTTGTTGTTCTTTTCAAAGGTGTGAGGTGTGA
GGTGCAAATTTTGGAGACTGGAGGAGGCTTGGTGAAGCCCGGTGGTTCCCTGAGACT
GTCTTGTGCAACGTCTGGATTCAATTTCAATGATTATTTCATGAACTGGGTCCGTCAGG
CTCCAGAAAAGGGGCTAGAGTGGGTTGCTCAAATAAGGAACAAAATTTATACTTATGC
CACATTTTATGCGGAGTCTTTGGAAGGCAGAGTCACAATCTCACGAGACGATTCCGAA
AGCAGTGTCTACCTGCAAGTGAGCAGTTTAAGAGCTGAAGACACTGCCATTTATTACT
GTACAAGATCCCTAACTGGGGGAGACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGG
TCACAGTCTCCTTAGCTGAAACAACAGCCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCTGGAAC
TGCTCTCAAAAGTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGC

Secuencia de señal (1-57), Región variable (58-420), secuencia parcial de región constante (421-501)

SEQ ID NO:28: Secuencia de aminoácidos codificada por cadena pesada #32A1 (región variable + alfa) clonada de rata

MKLWLSWIFLVVLFKGVRCEVQILETGGGLVKPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQA
PEKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRVTISRDDSESSVYLQVSSLRAEDTAIYYCTRSL
TGGDYFDYWGQGVMVTVSLAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGC

Secuencia de señal (1-19), Región variable (20-140), Secuencia parcial de región constante (141-167)

Figura 24

SEQ ID NO:29: Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de #32A1 de rata (Región variable + alfa)

ATGGAGACAGACAGACTCCTGCTATGGGCACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACT
GGTGACATTGTCTTGACCCAGTCTCCTGCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCC
ACAATCTCCTGTAGGGCCAGCCAAAGTGTCACTATTTCTGGATATAGTTTTATACACTG
GTACCAACAGAAACCAGGACAGCAACCCAGACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTA
GCCTCTGGGATCCCGGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTC
ACCATCAATCCTGTGCAGGCTGATGATATTGCAACCTATTTCTGTCAGCAGAGTAGGA
AATCTCCGTGGACGTTCGCTGGAGGCACCAAGCTGGAATTGAGACGGGCTGATGCTG
CACCAACTGTATCT

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-396), Secuencia parcial de región constante (397-417)

SEQ ID NO:30: Secuencia de aminoácidos codificada por cadena ligera de #32A1 clonada de rata (Región variable + alfa)

METDRLLLWALLLWVPGSTGDIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQ
KPGQQPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTINPVQADDIATYFCQQSRKSPWTFA
GGTKLELRRADAAPTVS

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-132), Secuencia parcial de región constante (133-139)

Figura 25

SEQ ID NO:40: Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de anticuerpo quimérico humano #32A1

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC
GAGGTGCAAATTTTGGAGACTGGAGGAGGCTTGGTGAAGCCCGGTGGTTCCCTGAGA
CTGTCTTGTGCAACGTCTGGATTCAATTTCAATGATTATTTCATGAACTGGGTCCGTCA
GGCTCCAGAAAAGGGGCTAGAGTGGGTTGCTCAAATAAGGAACAAAATTTATACTTAT
GCCACATTTTATGCGGAGTCTTTGGAAGGCAGAGTCACAATCTCACGAGACGATTCCG
AAAGCAGTGTCTACCTGCAAGTGAGCAGTTTAAGAGCTGAAGACACTGCCATTTATTA
CTGTACAAGATCCCTAACTGGGGGAGACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATG
GTCACAGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGC
CCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA
AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGG
TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
AAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAATGA

Secuencia de señal (1-57), Región variable (58-420), Región constante (421-1413, incluyendo codón de detención)

SEQ ID NO:41: Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo quimérico humano #32A1

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQILETGGGLVKPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQA
PEKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRVTISRDDSESSVYLQVSSLRAEDTAIYYCTRSL
TGGDYFDYWGQGVMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de señal (1-19), Región variable (20-140), Región constante (141-470)

Figura 26

SEQ ID NO:42: Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anticuerpo quimerico humano #32A1

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATAT
GGCGACATTGTCTTGACCCAGTCTCCTGCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCC
ACAATCTCCTGTAGGGCCAGCCAAAGTGTCACTATTTCTGGATATAGTTTTATACACTG
GTACCAACAGAAACCAGGACAGCAACCCAGACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTA
GCCTCTGGGATCCCGGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTC
ACCATCAATCCTGTGCAGGCTGATGATATTGCAACCTATTTCTGTCAGCAGAGTAGGA
AATCTCCGTGGACGTTCGCTGGAGGCACCAAGCTGGAATTGAGACGTACGGTGGCCG
CCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCT
CCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG
TGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAG
AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCAC
CAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGTTAG

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-396), Región constante (397-714, incluyendo codón de detención)

SEQ ID NO: 43: Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo quimérico humano #32A1

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQK
PGQQPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTINPVQADDIATYFCQQSRKSPWTFAG
GTKLELRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-132), Región constante (133-237)

Figura 27

SEQ ID NO:50: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T1H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AACTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAACCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCGC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAAGCCCCTGGCAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAAATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTTCAAATGAACTCCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Secuencia de señal (1-57), Región variable (58-420), Región constante (421-1410)

SEQ ID NO:51: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T1H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de señal (1-19), Región variable (20-140), Región constante (141-470)

Figura 28

SEQ ID NO:52: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T2H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AACTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTGGTGCAACCTGGCGGCTCCCTGAGACTGAGCTGTGCCGC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAAGCCCCTGAGAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAAATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTGG
AGGGCAGAGTGACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAATGTCCTCCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCCTGACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Secuencia de señal (1-57), Región variable (58-420), Región constante (421-1410)

SEQ ID NO:53: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T2H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPEKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRVTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de señal (1-19), Región variable (20-140), Región constante (141-470)

Figura 29

SEQ ID NO:54: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T3H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AGATCGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCAC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAGGCCCCTGAGAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAGATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGAGTGACCATCTCCAGAGACGACAGCGAGTCCAGCGTGTACCTTCAGATGTCCAGCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTACCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Secuencia de señal (1-57), Región variable (58-420), Región constante (421-1410)

SEQ ID NO:55: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T3H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQIVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPEKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRVTISRDDSESSVYLQMSSLRAEDTAVYYCTRSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de señal (1-19), Región variable (20-140), Región constante (141-470)

Figura 30

SEQ ID NO:56: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T5H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AGGTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCAC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAGATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGTCCACCGTGTACCTTCAGATGAACTCCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTACCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Secuencia de señal (1-57), Región variable (58-420), Región constante (421-1410)

SEQ ID NO:57: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T5H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPGKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRFTISRDNSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de señal (1-19), Región variable (20-140), Región constante (141-470)

Figura 31

SEQ ID NO:58: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T6H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AGGTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCAC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAGGCCCCTGAGAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAGATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGAGTGACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGTCCACCGTGTACCTTCAGATGTCCAGCCT
TAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTACCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCACCCTTGTGACAGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Secuencia de señal (1-57), Región variable (58-420), Región constante (421-1410)

SEQ ID NO:59: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T6H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPEKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRVTISRDNSKSTVYLQMSSLRAEDTAVYYCTRSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de señal (1-19), Región variable (20-140), Región constante (141-470)

Figura 32

SEQ ID NO:60: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T1L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGATGACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCCTCCTAAGCTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCGTGCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCGTGTACTACTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-399), Región constante (400-714)

SEQ ID NO:61: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T1L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQPPKLLIYRASNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-133), Región constante (134-238)

Figura 33

SEQ ID NO:62: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T2L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGATGACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAGCTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCCTCCTAGACTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCGTGCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCGTGTACTTCTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGCCGGCGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-399), Región constante (400-714)

SEQ ID NO:63: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T2L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQPPRLLIYRASNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFAGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-133), Región constante (134-238)

Figura 34

SEQ ID NO:64: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T3L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGCTTACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAGCTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCAGCCTAGACTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCATCCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCACCTACTTCTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGCCGGCGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-399), Región constante (400-714)

SEQ ID NO:65: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T3L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQQPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYFCQQSRKSPWTFAGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-133), Región constante (134-238)

Figura 35

SEQ ID NO:66: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T4L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGCTTACCCAGAGCCCTGCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAGCTGTAG
AGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGC
CAGCAGCCTAGACTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCATCCCTGCCAGATTCT
CCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGTGGC
CACCTACTTCTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGCCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGT
CCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTG
GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGG
TGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGG
GGAGTGT

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-396), Región constante (400-711)

SEQ ID NO:67: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T4L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPALAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPG
QQPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYFCQQSRKSPWTFAGGTKLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-132), Región constante (133-237)

Figura 36

SEQ ID NO:68: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T5L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGCTTACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCCTCCTAAGCTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCATCCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCACCTACTACTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-399), Región constante (400-714)

SEQ ID NO:69: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T5L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQPPKLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYYCQQSRKSPWTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-133), Región constante (134-238)

Figura 37

SEQ ID NO:70: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-T6L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGCTTACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAGCTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCATCCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCACCTACTTCTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGCCGGCGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-399), Región constante (400-714)

SEQ ID NO:71: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T6L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQPPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYFCQQSRKSPWTFAGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-133), Región constante (134-238)

Figura 38

SEQ ID NO:72: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T7H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPEKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Región variable (1-121), Región constante (122-451)

SEQ ID NO:73: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T8H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Región variable (1-121), Región constante (122-451)

SEQ ID NO:74: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T9H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Región variable (1-121), Región constante (122-451)

Figura 39

SEQ ID NO:75: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T10H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPEKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Región variable (1-121), Región constante (122-451)

SEQ ID NO:76: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T11H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPEKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Región variable (1-121), Región constante (122-451)

SEQ ID NO:77: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T12H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRVTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Región variable (1-121), Región constante (122-451)

Figura 40

SEQ ID NO:78: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T7L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:79: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T8L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:80: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T9L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:81: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T10L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218

SEQ ID NO:82: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-11L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

Figura 41

SEQ ID NO:83: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T12L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:84: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T13L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:85: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T14L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:86: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T15L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:87: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T16L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

Figura 42

SEQ ID NO:88: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T17L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:89: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T18L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:90: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T19L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:91: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T20L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:92: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T21L

EILMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQAPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCQQSRKSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

Figura 43

SEQ ID NO:93: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T22L

EILMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQAPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYFCQQSRKSPWTFAQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:94: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T23L

EILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQAPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCQQSRKSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:95: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T24L

EILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQAPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCQQSRKSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

SEQ ID NO:96: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-T25L

DILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQQPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYFCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable (1-113), Región constante (114-218)

Figura 44

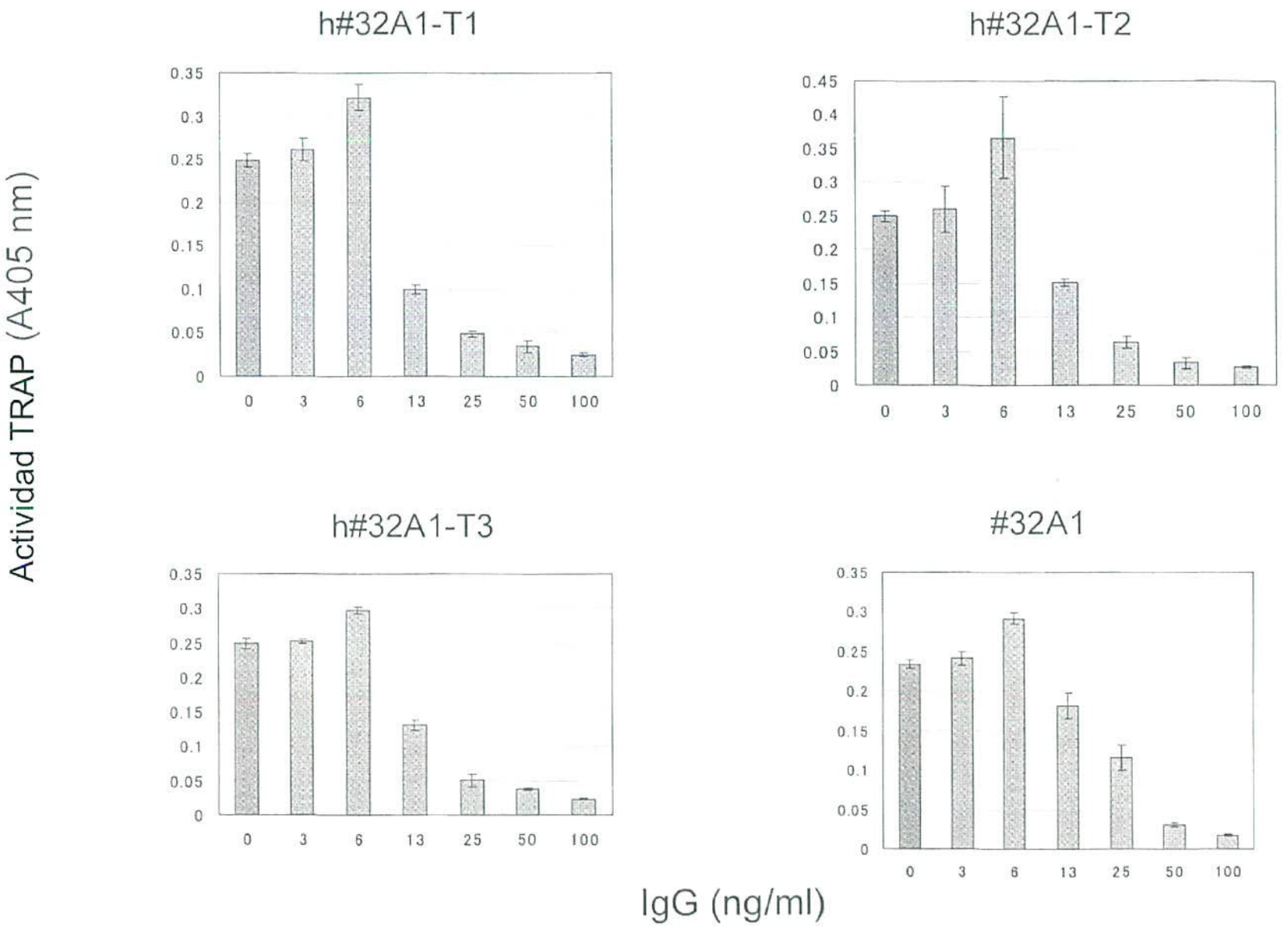

h#32A1-T1
h#32A1-T2
h#32A1-T3
#32A1
Actividad TRAP (A405 nm)
IgG (ng/ml)
0
3
6
13
25
50
100

Figura 45

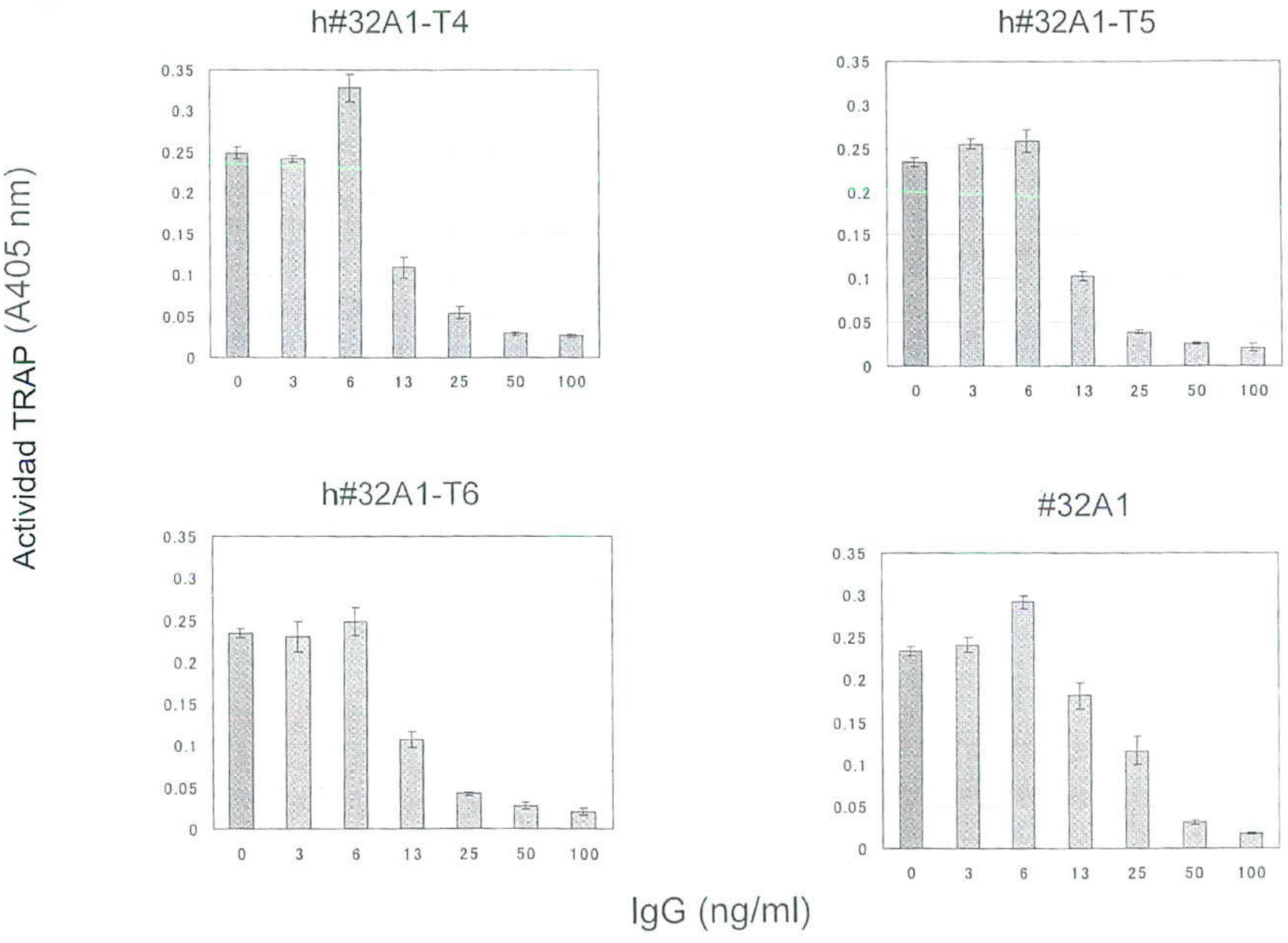

h#32A1-T4
h#32A1-T5
h#32A1-T6
#32A1
Actividad TRAP (A405 nm)
IgG (ng/ml)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0 3 6 13 25 50 100

Figura 46

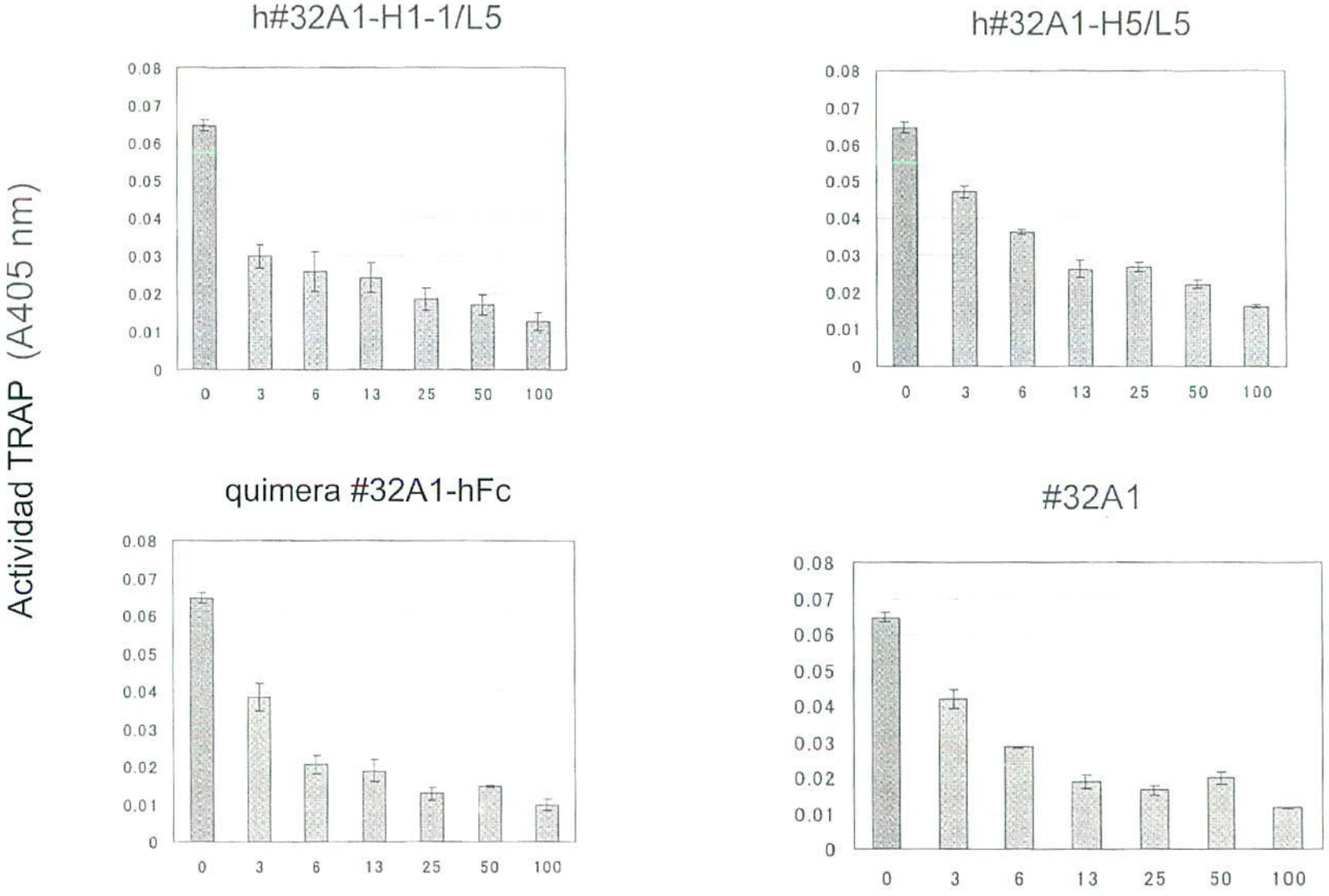

h#32A1-H1-1/L5
h#32A1-H5/L5
quimera #32A1-hFc
#32A1
Actividad TRAP (A405 nm)
IgG (ng/ml)
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0 3 6 13 25 50 100

Figura 47

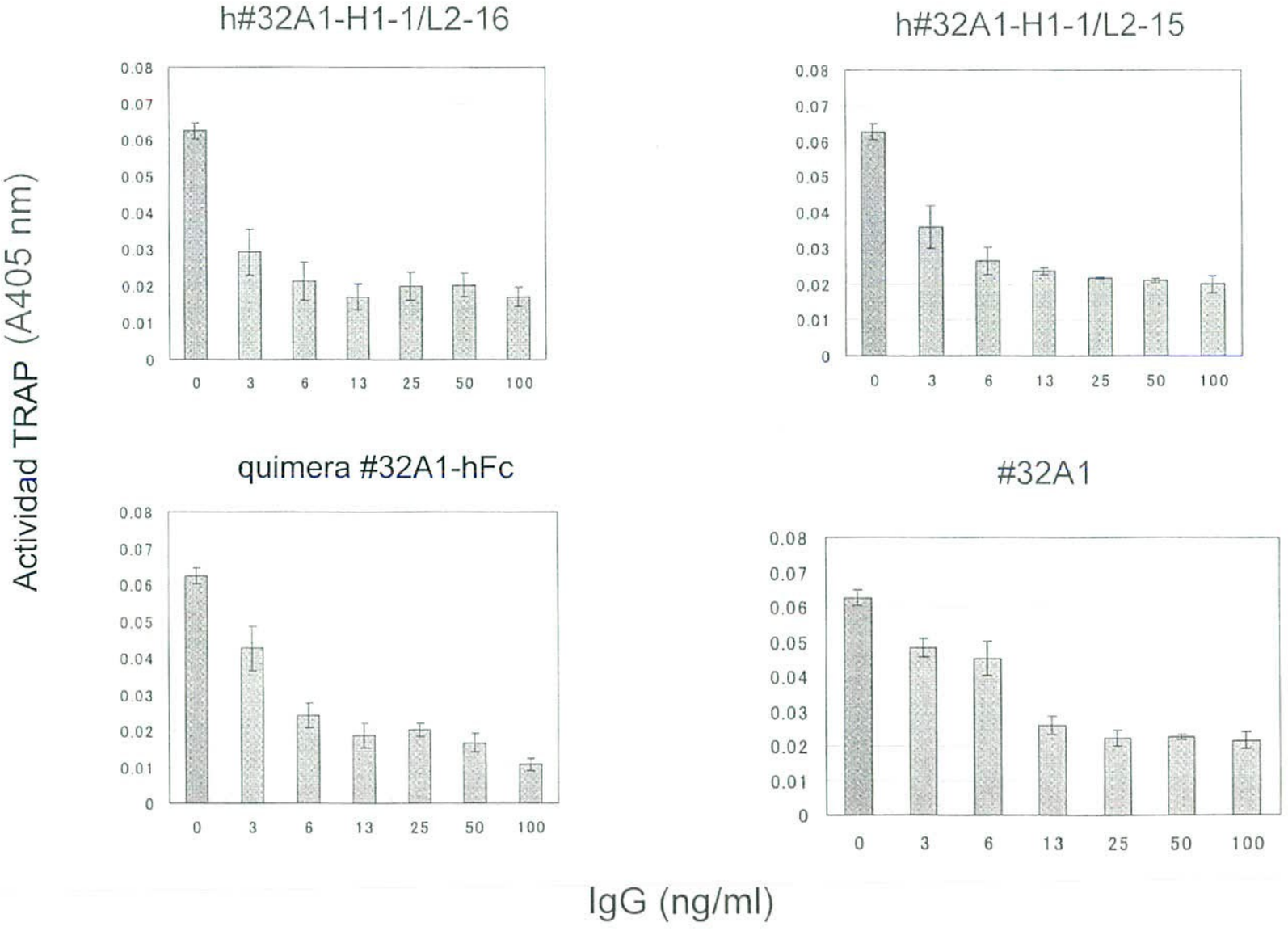
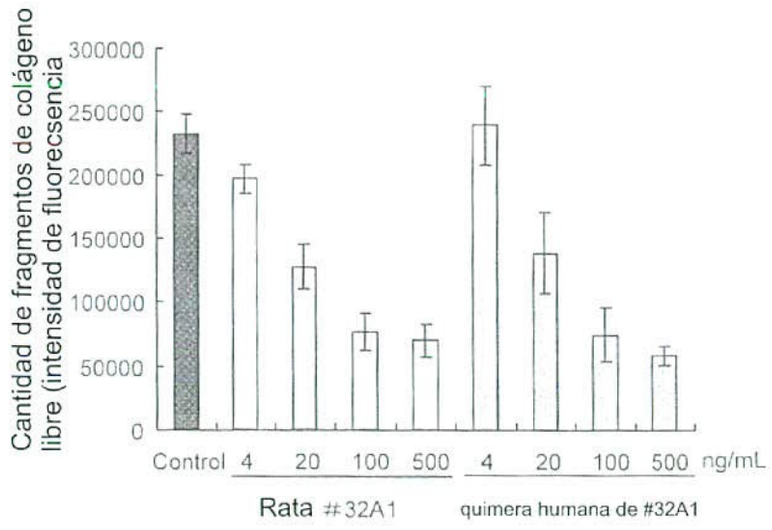
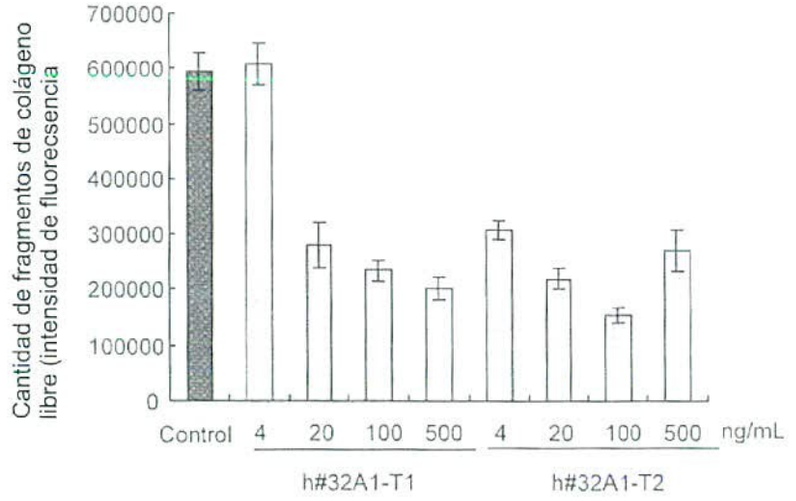
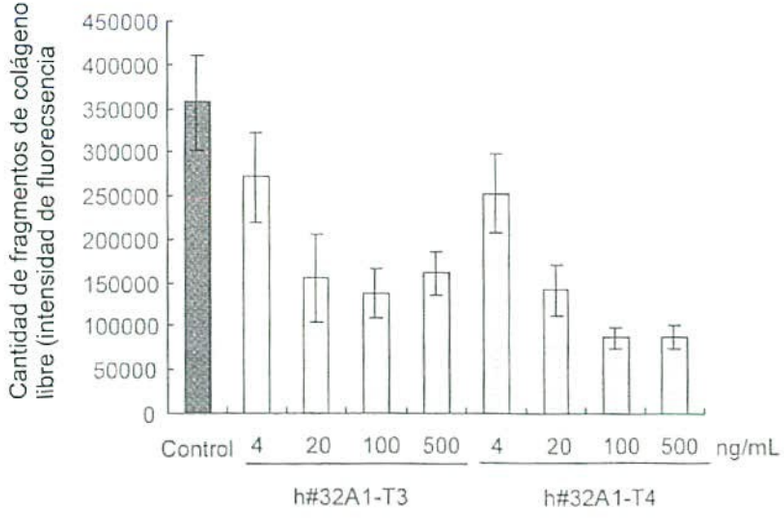

h#32A1-H1-1/L2-16
h#32A1-H1-1/L2-15
quimera #32A1-hFc
#32A1
Actividad TRAP (A405 nm)
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
3
6
13
25
50
100
IgG (ng/ml)

Figura 48


Cantidad de fragmentos de colágeno libre (intensidad de fluorecsencia
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Control 4 20 100 500 4 20 100 500 ng/mL
Rata #32A1
quimera humana de #32A1


Cantidad de fragmentos de colágeno libre (intensidad de fluorecsencia
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Control 4 20 100 500 4 20 100 500 ng/mL
h#32A1-T1
h#32A1-T2


Cantidad de fragmentos de colágeno libre (intensidad de fluorecsencia
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Control 4 20 100 500 4 20 100 500 ng/mL
h#32A1-T3
h#32A1-T4

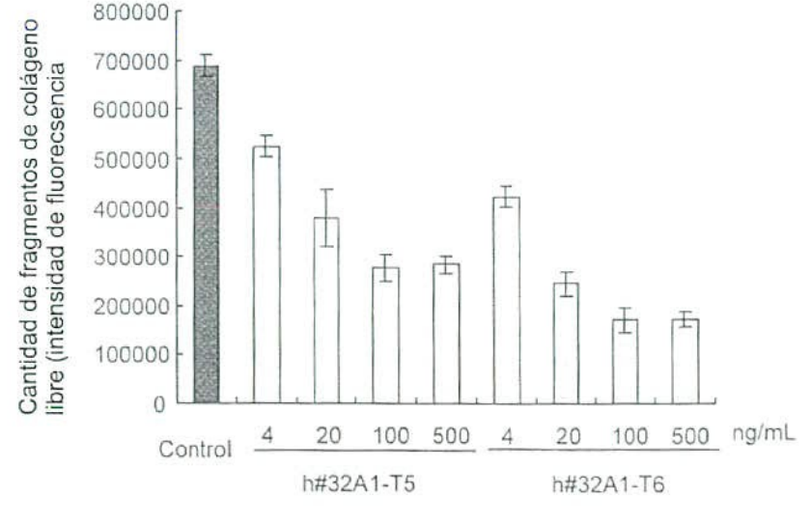
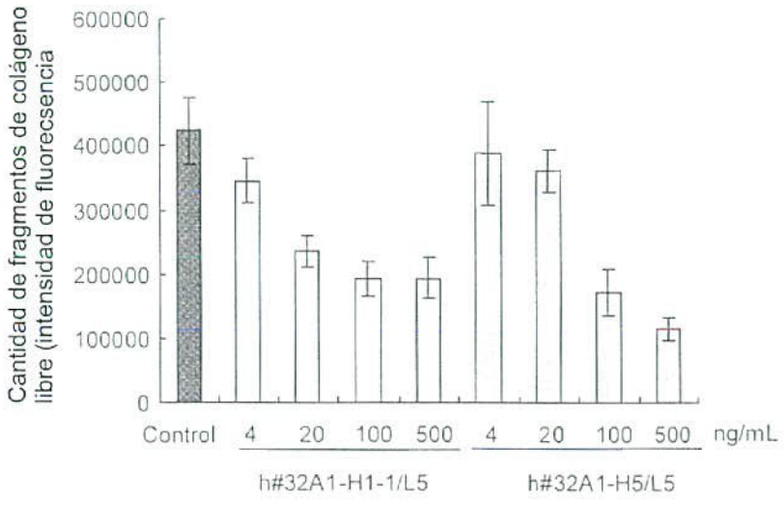

Cantidad de fragmentos de colágeno libre (intensidad de fluorecsencia
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Control 4 20 100 500 4 20 100 500 ng/mL
h#32A1-T5
h#32A1-T6

Figura 49


Cantidad de fragmentos de colágeno libre (intensidad de fluorecsencia
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Control
4
20
100
500
4
20
100
500
ng/mL
h#32A1-H1-1/L5
h#32A1-H5/L5

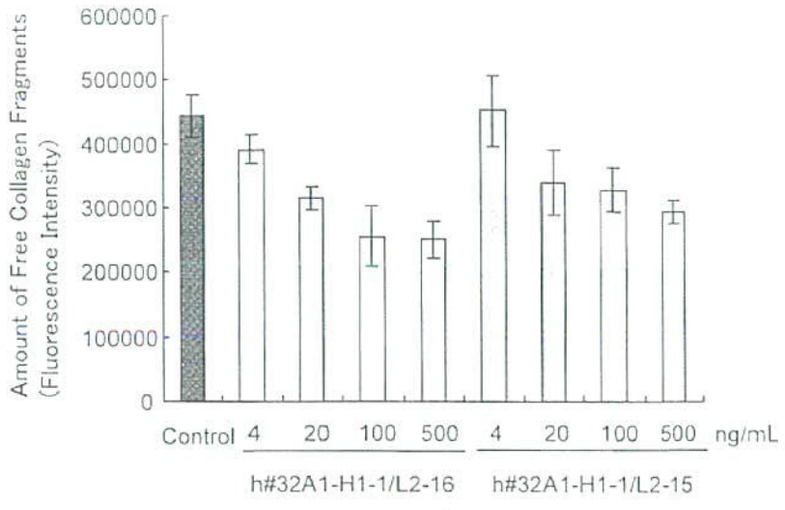

Amount of Free Collagen Fragments (Fluorescence Intensity)
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Control
4
20
100
500
4
20
100
500
ng/mL
h#32A1-H1-1/L2-16
h#32A1-H1-1/L2-15

Figura 50

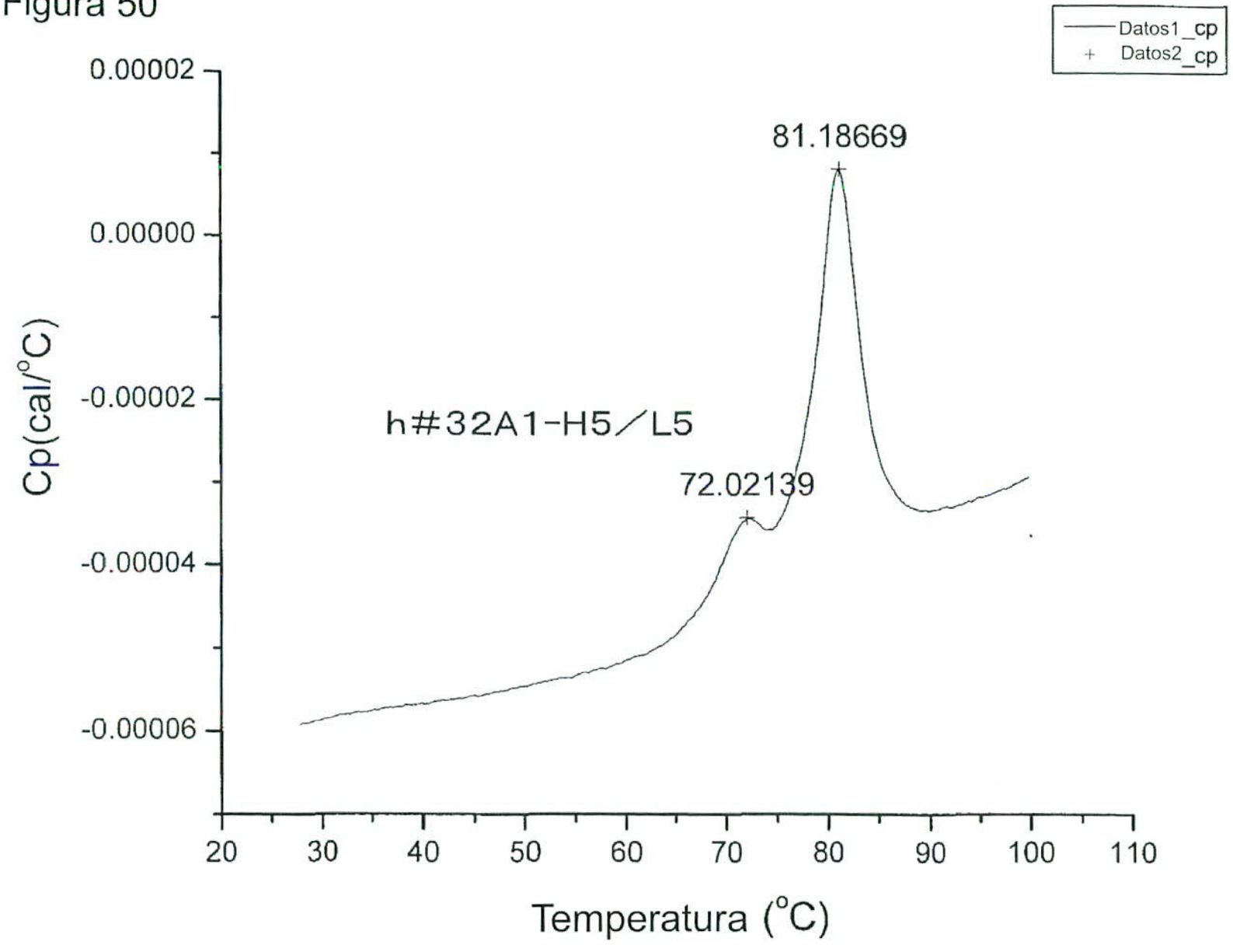

Datos1_cp
Datos2_cp
81.18669
h#32A1-H5/L5
72.02139
Cp(cal/°C)
0.00002
0.00000
-0.00002
-0.00004
-0.00006
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Temperatura (°C)

Figura 51

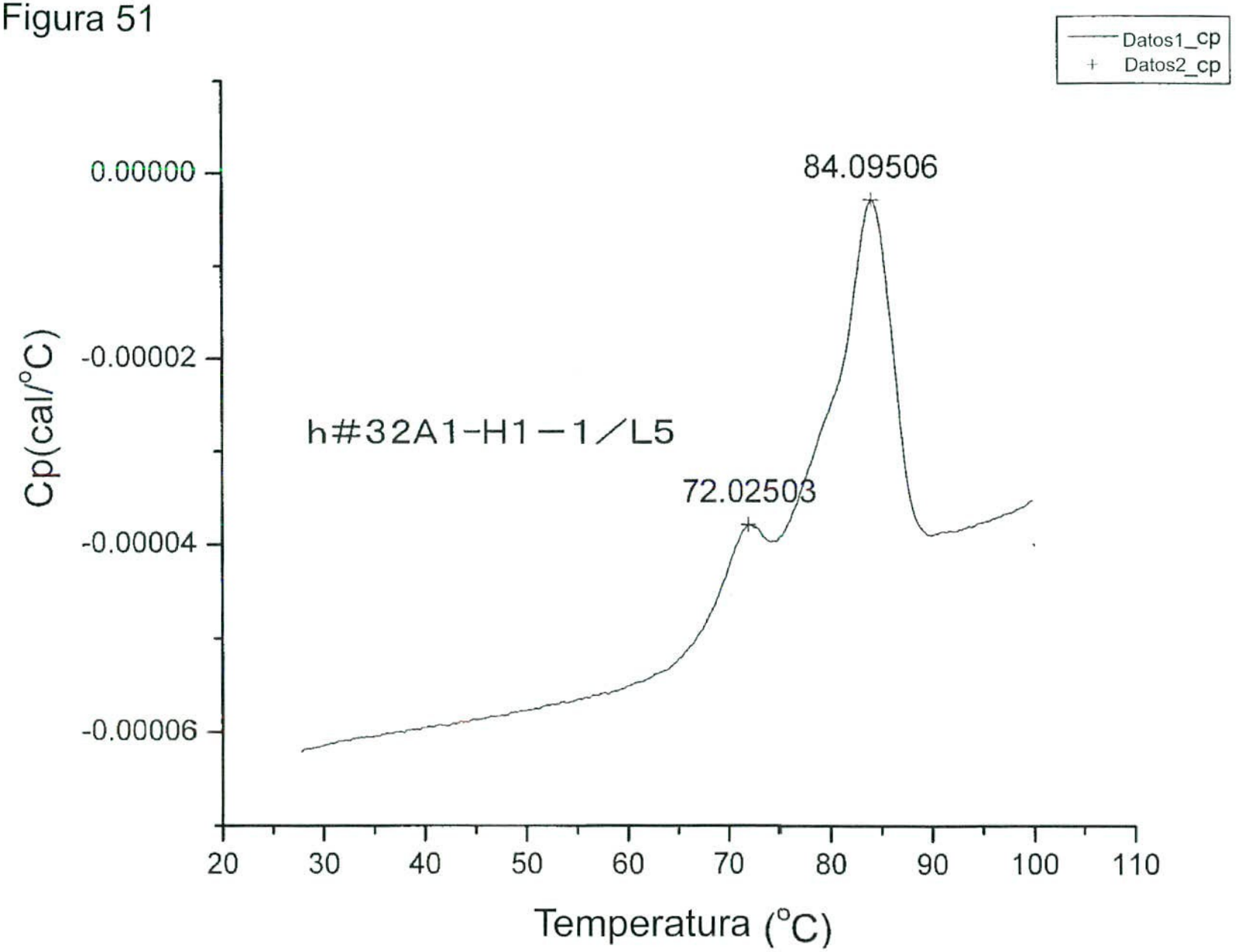

Datos1_cp
Datos2_cp
84.09506
72.02503
h#32A1-H1－1／L5
0.00000
-0.00002
-0.00004
-0.00006
Cp(cal/°C)
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Temperatura (°C)

Figura 52

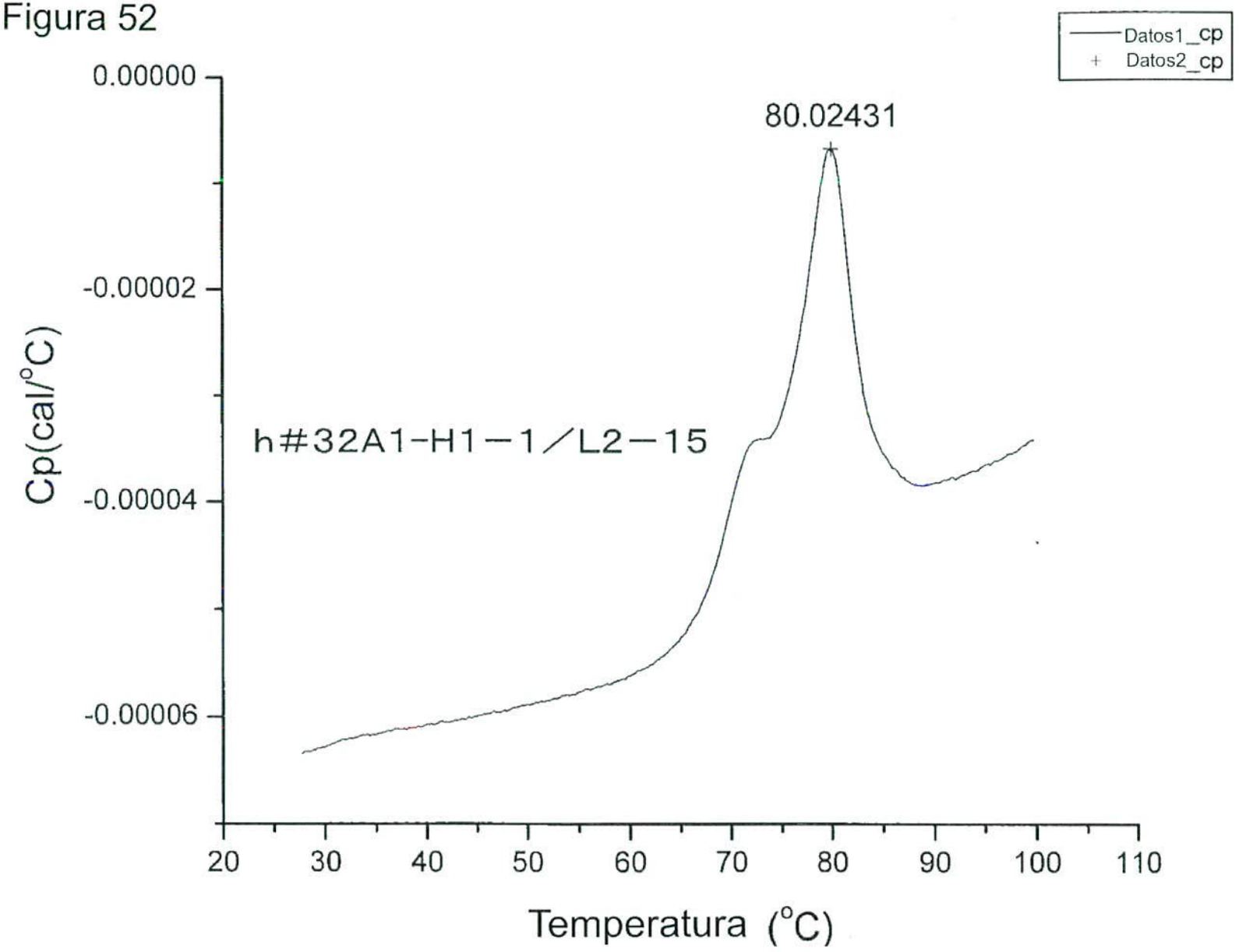

Datos1_cp
Datos2_cp
80.02431
h#32A1-H1−1／L2−15
0.00000
-0.00002
-0.00004
-0.00006
Cp(cal/°C)
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Temperatura (°C)

Figura 53

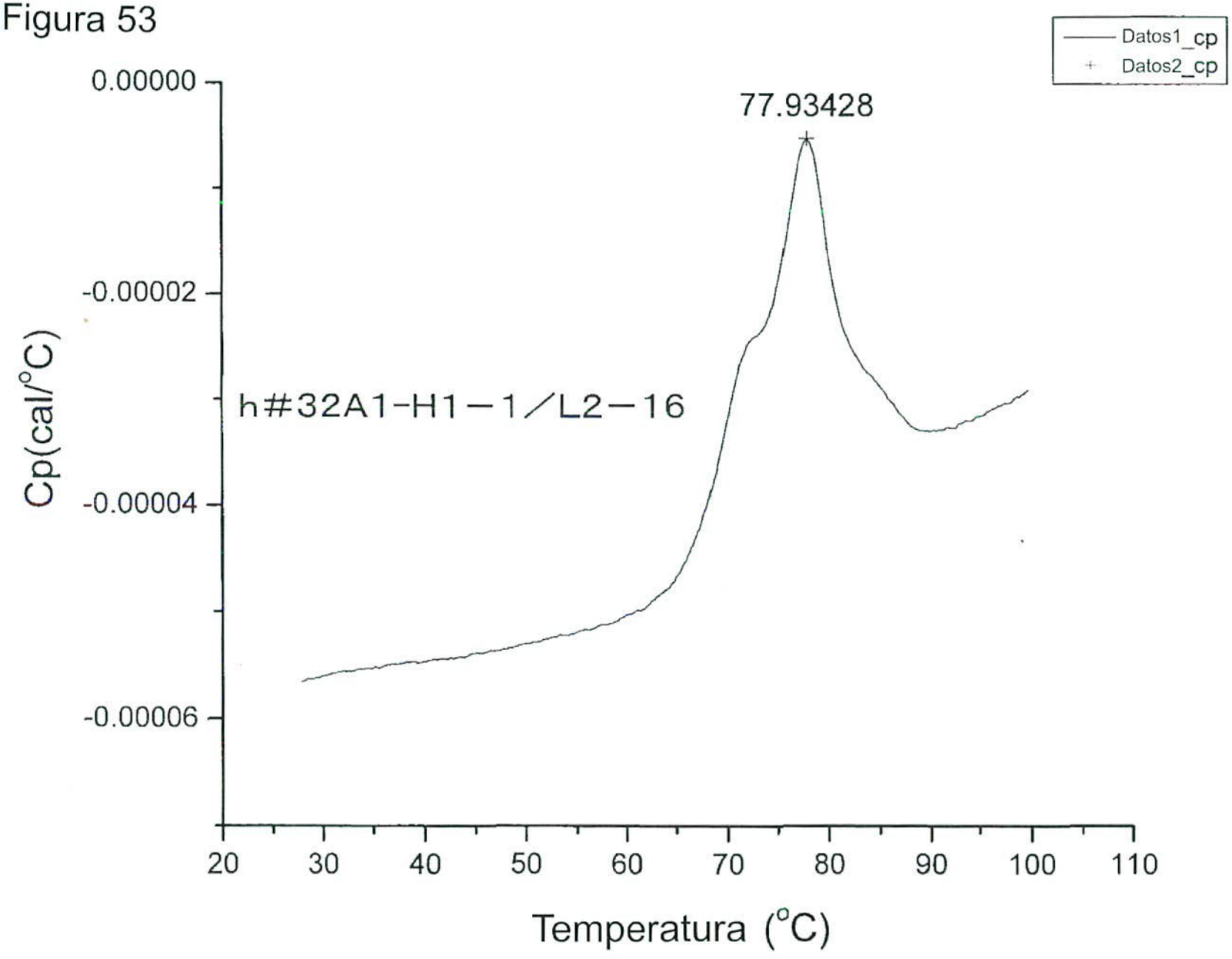

Datos1_cp
Datos2_cp
77.93428
h#32A1-H1−1/L2−16
0.00000
-0.00002
-0.00004
-0.00006
Cp(cal/°C)
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Temperatura (°C)

Figura 54

SEQ ID NO:98: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-H1-1

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTCC
AGCTTGTGGAAAGCGGAGGGGGACTCGTTCAGCCAGGAGGCTCTCTGCGCCTGTCATGCGCTGC
CAGCGGATTTAATTTCAATGATTATTTTATGAACTGGGTCAGGCAGGCTCCGGGAAAAGGGCTG
GAATGGGTCGCCCAGATCAGAAACAAGATCTATACTTACGCTACATTCTACGCCGCATCTGTAA
AGGGGAGGTTTACAATTAGTCGCGACAATGCAAAAAATAGTCTGTATCTCCAAATGAACTCCCT
CCGCGCAGAGGATACTGCTGTCTACTACTGCGCCAGGTCCTTGACTGGCGGCGACTATTTTGAT
TACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACGGTGAGCTCAGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCC
CTCTGGCCCCTTGTAGCCGTTCCACCAGCGAGTCCACCGCCGCCCTTGGCTGTCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACTCCGGAGCCCTTACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTTTACTCCCTGAGCTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCT
CCAACTTCGGCACCCAAACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGACCGTGGAGCGTAAGTGTTGTGTGGAGTGTCCTCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCCGGA
CCTTCCGTGTTCCTTTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGTACCCCTGAGG
TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGTGAGGAGCAATTCAACAGCACCTTCCGT
GTGGTGTCCGTGCTTACCGTGGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGG
TGAGCAACAAGGGACTTCCTGCCCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGCCAACCTCG
TGAGCCTCAAGTGTACACCCTTCCTCCTAGCCGTGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTT
ACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAAC
CTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTTGACAGCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAG
CAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGTTGGCAACAAGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAAAAGAGCCTTTCCCTGAGCCCTGGAAAG

Secuencia de señal (1-57), Región variable (58-420), Región constante (421-1398)

SEQ ID NO:99: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-H1-1

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAASVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de señal (1-19), Región variable (20-140), Región constante (141-466)

Figura 55

SEQ ID NO:100: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-H5

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AGGTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCAC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAGATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGTCCACCGTGTACCTTCAGATGAACTCCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTACCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCC
CTCTGGCCCCTTGTAGCCGTTCCACCAGCGAGTCCACCGCCGCCCTTGGCTGTCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACTCCGGAGCCCTTACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTTTACTCCCTGAGCTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCT
CCAACTTCGGCACCCAAACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGACCGTGGAGCGTAAGTGTTGTGTGGAGTGTCCTCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCCGGA
CCTTCCGTGTTCCTTTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGTACCCCTGAGG
TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGTGAGGAGCAATTCAACAGCACCTTCCGT
GTGGTGTCCGTGCTTACCGTGGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGG
TGAGCAACAAGGGACTTCCTGCCCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGCCAACCTCG
TGAGCCTCAAGTGTACACCCTTCCTCCTAGCCGTGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTT
ACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAAC
CTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTTGACAGCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAG
CAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGTTGGCAACAAGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAAAAGAGCCTTTCCCTGAGCCCTGGAAAG

Secuencia de señal (1-57), Región variable (58-420), Región constante (421-1398)

SEQ ID NO:101: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-H5

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPGKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRFTISRDNSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de señal (1-19), Región variable (20-140), Región constante (141-466)

Figura 56

SEQ ID NO:102: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-L2-15

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGAAA
TTCTGATGACGCAGAGTCCTGCAACTCTTAGTCTGTCACCTGGCGAGAGAGCCACACTCAGCTG
CCGAGCGTCCCAGTCCGTGACCATTAGCGGCTATTCTTTTATTCATTGGTATCAGCAAAAGCCT
GGACAGGCGCCAAGGCTGCTCATTTACAGAGCAAGCAACCTTGCCTCTGGCATTCCAGCAAGAT
TCAGCGGGAGCGGATCAGGGACAGATTTCACCTTGACCATCTCCTCCCTGGAGCCGGAGGATTT
CGCGTTGTATTATTGTCAGCAATCTAGGAAGAGTCCATGGACATTTGGCCAGGGCACCAAAGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-399), Región constante (400-714)

SEQ ID NO:103: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-L2-15

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEILMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQAPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCQQSRKSPWTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-133), Región constante (134-238)

Figura 57

SEQ ID NO:104: Secuencia de nucleótidos de h#32A1-L2-16

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGAAA
TCCTGATGACACAGAGTCCTGCGACCCTCTCCCTCTCACCAGGCGAGAGGGCCACCCTGTCTTG
TAGAGCCAGCCAGTCAGTCACTATTAGTGGATACTCATTTATCCATTGGTATCAACAGAAACCA
GGACAGGCGCCTCGGCTTCTGATCTACCGCGCCTCAAACCTTGCCTCTGGCATCCCCGCGAGGT
TCTCTGGCTCTGGCAGCGGTACCGATTTTACACTGACTATCTCAAGCCTCGAACCTGAAGACTT
CGCACTGTACTTTTGCCAGCAGAGCAGGAAGTCCCCCTGGACTTTTGCACAGGGAACCAAAGTC
GAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Secuencia de señal (1-60), Región variable (61-399), constant Region (400-714)

SEQ ID NO:105: Secuencia de aminoácidos de h#32A1-L2-16

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEILMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQAPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYFCQQSRKSPWTFAQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de señal (1-20), Región variable (21-133), constant Region (134-238)

260

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Solicitante: DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Título de la invención: ANTICUERPO ANTI-LECTINA SIMILAR A INMUNOGLOBULINA DE UNIÓN A ÁCIDO SIÁLICO-15

<130> Número de referencia: DSPCT-FP1021

<150> Número de solicitud previa: JP 2009-94613
<151> Fecha de presentación de la solicitud previa: 2009-04-09

<160> Números de secuencias: 106

<170> Software: PatentIn versión 3.4

<210> SEQ ID NO: 1
<211> Longitud: 987
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(987)
<223> Otra información: Inventor: Hiruma, Yoshiharu; Tsuda, Eisuke
<223> Otra información: Inventor: Takizawa, Takeshi; Nakayama, Makiko

<400> Secuencia: 1

```
atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg      48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                  10                  15

aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc      96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg     144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc     192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc     240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct     288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

gcg gcg cgg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc     336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc     384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc     432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc     480
```

```
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag      576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc      672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc      720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat      768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

ggc gcc agc ggg gcc tcg acg gtc gcc ctc ctg ctc ggc gct ctc ggc      816
Gly Ala Ser Gly Ala Ser Thr Val Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly
            260                 265                 270

ttc aag gcg ctg ctg ctg ctc ggg gtc ctg gcc gcc cgc gct gcc cgc      864
Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Arg Ala Ala Arg
        275                 280                 285

cgc cgc cca gag cat ctg gac acc ccg gac acc cca cca cgg tcc cag      912
Arg Arg Pro Glu His Leu Asp Thr Pro Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln
    290                 295                 300

gcc cag gag tcc aat tat gaa aat ttg agc cag atg aac ccc cgg agc      960
Ala Gln Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Asn Pro Arg Ser
305                 310                 315                 320

cca cca gcc acc atg tgc tca ccg tga                                  987
Pro Pro Ala Thr Met Cys Ser Pro
                325
```

<210> SEQ ID NO: 2
<211> Longitud: 328
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Secuencia: 2

```
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                   10                  15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45
```

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
50 55 60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65 70 75 80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
85 90 95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
100 105 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
130 135 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145 150 155 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
165 170 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
180 185 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
195 200 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
210 215 220

Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
245 250 255

Gly Ala Ser Gly Ala Ser Thr Val Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly
260 265 270

Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Arg Ala Ala Arg
275 280 285

Arg Arg Pro Glu His Leu Asp Thr Pro Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln
290 295 300

Ala Gln Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Asn Pro Arg Ser

263

305 310 315 320

Pro Pro Ala Thr Met Cys Ser Pro
325

<210> SEQ ID NO: 3
<211> Longitud: 1026
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Mus musculus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1026)

<400> Secuencia: 3

```
atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag      48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                  10                  15

atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc      96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg     144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc     192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc     240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc     288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc     336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc     384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg     432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc     480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg     528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag     576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190
```

264

```
ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg      672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc      720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc      768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

ccc gga acc tcg acc cta gcg ctc ctg ctg ggc gcg ctg ggc ctc aag      816
Pro Gly Thr Ser Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly Leu Lys
            260                 265                 270

gcc ttg ctg ctg ctt ggc att ctg gga gcg cgt gcc acc cga cgc cga      864
Ala Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu Gly Ala Arg Ala Thr Arg Arg Arg
        275                 280                 285

cta gat cac ctg gtc ccc cag gac acc cct cca cgg tct cag gct cag      912
Leu Asp His Leu Val Pro Gln Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln Ala Gln
    290                 295                 300

gag tcc aat tat gaa aat ttg agc cag atg agt cct cca ggc cac cag      960
Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Ser Pro Pro Gly His Gln
305                 310                 315                 320

ctg cca cgt gtt tgc tgt gag gaa ctc ctc agc cat cac cat cta gtc     1008
Leu Pro Arg Val Cys Cys Glu Glu Leu Leu Ser His His His Leu Val
                325                 330                 335

att cac cat gag aaa taa                                         1026
Ile His His Glu Lys
            340
```

<210> SEQ ID NO: 4
<211> Longitud: 341
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<400> Secuencia: 4

```
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                   10                  15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
```

```
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

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

Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

Pro Gly Thr Ser Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly Leu Lys
            260                 265                 270

Ala Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu Gly Ala Arg Ala Thr Arg Arg Arg
        275                 280                 285

Leu Asp His Leu Val Pro Gln Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln Ala Gln
    290                 295                 300

Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Ser Pro Pro Gly His Gln
305                 310                 315                 320

Leu Pro Arg Val Cys Cys Glu Glu Leu Leu Ser His His His Leu Val
                325                 330                 335
```

```
Ile His His Glu Lys
            340


<210>  SEQ ID NO: 5
<211>  Longitud: 774
<212>  Tipo: ADN
<213>  Organismo: Mus musculus


<220>  Característica:
<221>  Nombre/Clave: CDS
<222>  Ubicación: (1)..(774)

<400>  Secuencia: 5
atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag        48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                   10                  15

atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc        96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg       144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc       192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc       240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc       288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc       336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc       384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg       432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc       480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg       528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag       576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc       624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205
```

```
gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg      672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc      720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc      768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

ccc gga                                                             774
Pro Gly
```

<210> SEQ ID NO: 6
<211> Longitud: 258
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Mus musculus

<400> Secuencia: 6

```
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                   10                  15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
```

165 170 175

Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
180 185 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
195 200 205

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

Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225 230 235 240

Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
245 250 255

Pro Gly

<210> SEQ ID NO: 7
<211> Longitud: 55
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador PCR del ADNc de Siglec-15 soluble de ratón

<400> Secuencia: 7
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatggag gggtccctcc aactc 55

<210> SEQ ID NO: 8
<211> Longitud: 55
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador PCR del ADNc de Siglec-15 soluble de ratón

<400> Secuencia: 8
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tccgggggcg ccgtggaagc ggaac 55

<210> SEQ ID NO: 9
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador de secuenciación del ADNc de Siglec-15 soluble de ratón

<400> Secuencia: 9
tgcgtgaagg tgcagggcag 20

<210> SEQ ID NO: 10
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador de secuenciación del ADNc de Siglec-15 soluble de ratón

<400> Secuencia: 10
cctcgcctgg tcgggtc 17

<210> SEQ ID NO: 11
<211> Longitud: 891
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: ADNc de Siglec-15-His tag de ratón

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(891)

<400> Secuencia: 11

```
atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag      48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                  10                  15

atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc      96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg     144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc     192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc     240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc     288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc     336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc     384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg     432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc     480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160
```

```
cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag      576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg      672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc      720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc      768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

ccc gga gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc gaa ggt cgt      816
Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu Gly Arg
            260                 265                 270

ggg ggt aag cct atc cct aac cct ctc ctc ggt ctc gat tct acg cgt      864
Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg
        275                 280                 285

acc ggt cat cat cac cat cac cat tga                                  891
Thr Gly His His His His His His
    290                 295
```

<210> SEQ ID NO: 12
<211> Longitud: 296
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 12

```
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                   10                  15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
```

```
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

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

Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu Gly Arg
            260                 265                 270

Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg
        275                 280                 285

Thr Gly His His His His His His
    290                 295
```

<210> SEQ ID NO: 13
<211> Longitud: 1512
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: ADNc de Siglec-15 de ratón fusionado a Fc

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1512)

<400> Secuencia: 13

```
atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag      48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                  10                  15

atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc      96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg     144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc     192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc     240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc     288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc     336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc     384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg     432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc     480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg     528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag     576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc     624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg     672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc     720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240
```

```
ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc      768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

ccc gga gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc cag gca gag      816
Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln Ala Glu
            260                 265                 270

ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      864
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
        275                 280                 285

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      912
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
    290                 295                 300

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      960
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305                 310                 315                 320

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac     1008
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                325                 330                 335

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac     1056
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
            340                 345                 350

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1104
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        355                 360                 365

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1152
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    370                 375                 380

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1200
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385                 390                 395                 400

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag     1248
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                405                 410                 415

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1296
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            420                 425                 430

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1344
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        435                 440                 445

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1392
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    450                 455                 460

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1440
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465                 470                 475                 480

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc     1488
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                485                 490                 495

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa                                    1512
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
```

500

<210> SEQ ID NO: 14
<211> Longitud: 503
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 14

Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1 5 10 15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
20 25 30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
35 40 45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
50 55 60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65 70 75 80

Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
85 90 95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
100 105 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
130 135 140

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145 150 155 160

Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
165 170 175

Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
180 185 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
195 200 205

Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu

210 215 220

Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225 230 235 240

Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
245 250 255

Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln Ala Glu
260 265 270

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
275 280 285

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
405 410 415

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465 470 475 480

```
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                485                 490                 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            500
```

<210> SEQ ID NO: 15
<211> Longitud: 780
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDR
<222> Ubicación: (1)..(780)

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(780)

<400> Secuencia: 15

```
atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg      48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                  10                  15

aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc      96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg     144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc     192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc     240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct     288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

gcg gcg cgg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc     336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc     384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc     432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc     480
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg     528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
```

```
                165                 170                 175

ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag      576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc      672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc      720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat      768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

ggc gcc agc ggg                                                     780
Gly Ala Ser Gly
            260
```

<210> SEQ ID NO: 16
<211> Longitud: 260
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Secuencia: 16

```
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                   10                  15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125
```

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
130 135 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145 150 155 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
165 170 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
180 185 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
195 200 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
210 215 220

Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
245 250 255

Gly Ala Ser Gly
260

<210> SEQ ID NO: 17
<211> Longitud: 56
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador PCR de ADNc de Siglec-15 soluble humano

<400> Secuencia: 17
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatggaa aagtccatct ggctgc 56

<210> SEQ ID NO: 18
<211> Longitud: 52
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador PCR de ADNc de Siglec-15 soluble humano

<400> Secuencia: 18
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc cccgctggcg ccatggaagc gg 52

<210> SEQ ID NO: 19
<211> Longitud: 897
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: ADNc de Siglec-15-His tag humano

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(897)

<400> Secuencia: 19

```
atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg      48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                  10                  15

aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc      96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg     144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc     192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc     240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct     288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

gcg gcg cgg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc     336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc     384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc     432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc     480
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg     528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag     576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg     624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc     672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220
```

```
gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc      720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat      768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

ggc gcc agc ggg gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc gaa      816
Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu
            260                 265                 270

ggt cgt ggg ggt aag cct atc cct aac cct ctc ctc ggt ctc gat tct      864
Gly Arg Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser
        275                 280                 285

acg cgt acc ggt cat cat cac cat cac cat tga                          897
Thr Arg Thr Gly His His His His His His
    290                 295
```

<210> SEQ ID NO: 20
<211> Longitud: 298
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 20

```
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                   10                  15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140
```

```
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu
            260                 265                 270

Gly Arg Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser
        275                 280                 285

Thr Arg Thr Gly His His His His His His
    290                 295
```

<210> SEQ ID NO: 21
<211> Longitud: 1518
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: ADNc de Siglec-15 humano fusionado a Fc

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1518)

<400> Secuencia: 21

```
atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg      48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                  10                  15

aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc      96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg     144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45
```

```
cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc      192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc      240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct      288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

gcg gcg cgg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc      336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc      384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc      432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc      480
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag      576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc      672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc      720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat      768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

ggc gcc agc ggg gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc cag      816
Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln
            260                 265                 270

gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca      864
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
        275                 280                 285

gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa      912
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
    290                 295                 300

ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg      960
```

```
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
305                 310                 315                 320

gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac     1008
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
                325                 330                 335

gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag     1056
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
            340                 345                 350

cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac     1104
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
        355                 360                 365

cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa     1152
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
    370                 375                 380

gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag     1200
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
385                 390                 395                 400

ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg     1248
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
                405                 410                 415

acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc     1296
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
            420                 425                 430

agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac     1344
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
        435                 440                 445

tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc     1392
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
    450                 455                 460

tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc     1440
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
465                 470                 475                 480

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag     1488
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
                485                 490                 495

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa                             1518
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            500                 505
```

<210> SEQ ID NO: 22
<211> Longitud: 505
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 22

```
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                   10                  15
```

```
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln
            260                 265                 270

Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
        275                 280                 285
```

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
290 295 300

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
305 310 315 320

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
325 330 335

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
340 345 350

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
355 360 365

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
370 375 380

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
385 390 395 400

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
405 410 415

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
420 425 430

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
435 440 445

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
450 455 460

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
465 470 475 480

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
485 490 495

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> SEQ ID NO: 23
<211> Longitud: 33
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador PCR de ADNc de cadena pesada del anticuerpo #32A1 de rata

<400> Secuencia: 23
ggccgggtgg gctacgttgc aggtgacggt ctg 33

<210> SEQ ID NO: 24
<211> Longitud: 35
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador PCR de ADNc de cadena ligera del anticuerpo #32A1 de rata

<400> Secuencia: 24
catgctgtac gtgctgtctt tgctgtcctg atcag 35

<210> SEQ ID NO: 25
<211> Longitud: 29
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador de secuenciación del ADNc de cadena pesada del anticuerpo #32A1 de rata

<400> Secuencia: 25
ctccagagtt ccaggtcacg gtgactggc 29

<210> SEQ ID NO: 26
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador de secuenciación del ADNc de cadena ligera del anticuerpo #32A1 de rata

<400> Secuencia: 26
tccagttgct aactgttccg 20

<210> SEQ ID NO: 27
<211> Longitud: 501
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDA
<222> Ubicación: (1)..(501)

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(501)

<400> Secuencia: 27
atg aag ttg tgg ttg agc tgg ata ttc ctt gtt gtt ctt ttc aaa ggt 48
Met Lys Leu Trp Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Val Leu Phe Lys Gly
1 5 10 15

gtg agg tgt gag gtg caa att ttg gag act gga gga ggc ttg gtg aag 96
Val Arg Cys Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

```
ccc ggt ggt tcc ctg aga ctg tct tgt gca acg tct gga ttc aat ttc      144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aat gat tat ttc atg aac tgg gtc cgt cag gct cca gaa aag ggg cta      192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtt gct caa ata agg aac aaa att tat act tat gcc aca ttt      240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tat gcg gag tct ttg gaa ggc aga gtc aca atc tca cga gac gat tcc      288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                85                  90                  95

gaa agc agt gtc tac ctg caa gtg agc agt tta aga gct gaa gac act      336
Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc att tat tac tgt aca aga tcc cta act ggg gga gac tac ttt gat      384
Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc tcc tta gct gaa aca aca      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Leu Ala Glu Thr Thr
    130                 135                 140

gcc cca tct gtc tat cca ctg gct cct gga act gct ctc aaa agt aac      480
Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn
145                 150                 155                 160

tcc atg gtg acc ctg gga tgc                                         501
Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
                165
```

<210> SEQ ID NO: 28
<211> Longitud: 167
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<400> Secuencia: 28

```
Met Lys Leu Trp Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Val Leu Phe Lys Gly
1               5                   10                  15

Val Arg Cys Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
```

85 90 95

Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Leu Ala Glu Thr Thr
130 135 140

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

Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
165

<210> SEQ ID NO: 29
<211> Longitud: 417
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(417)

<400> Secuencia: 29

```
atg gag aca gac aga ctc ctg cta tgg gca ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

ggc tcc act ggt gac att gtc ttg acc cag tct cct gct ttg gct gtg      96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
            20                  25                  30

tct cta ggg cag agg gcc aca atc tcc tgt agg gcc agc caa agt gtc     144
Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
        35                  40                  45

act att tct gga tat agt ttt ata cac tgg tac caa cag aaa cca gga     192
Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
    50                  55                  60

cag caa ccc aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gcc tct ggg     240
Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65                  70                  75                  80

atc ccg gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc     288
Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                85                  90                  95

acc atc aat cct gtg cag gct gat gat att gca acc tat ttc tgt cag     336
Thr Ile Asn Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
            100                 105                 110

cag agt agg aaa tct ccg tgg acg ttc gct gga ggc acc aag ctg gaa     384
Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
        115                 120                 125
```

ttg aga cgg gct gat gct gca cca act gta tct 417
Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
130 135

<210> SEQ ID NO: 30
<211> Longitud: 139
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<400> Secuencia: 30

Met Glu Thr Asp Arg Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

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

Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Asn Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
100 105 110

Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
130 135

<210> SEQ ID NO: 31
<211> Longitud: 28
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador EFF1

<400> Secuencia: 31
ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagc 28

<210> SEQ ID NO: 32
<211> Longitud: 30
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:

296

<223> Otra información: Iniciador EFsmaR

<400> Secuencia: 32
aaacccggga gctttttgca aaagcctagg 30

<210> SEQ ID NO: 33
<211> Longitud: 1704
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Fragmento B

<400> Secuencia: 33
ggtaccaccc aagctggcta ggtaagcttg ctagcgccac catggtgctg cagacccagg 60

tgttcatctc cctgctgctg tggatctccg gcgcatatgg cgatatcgtg atgattaaac 120

gtacggtggc cgcccccctcc gtgttcatct tccccccctc cgacgagcag ctgaagtccg 180

gcaccgcctc cgtggtgtgc ctgctgaata acttctaccc cagagaggcc aaggtgcagt 240

ggaaggtgga caacgccctg cagtccggga actcccagga gagcgtgacc gagcaggaca 300

gcaaggacag cacctacagc ctgagcagca ccctgaccct gagcaaagcc gactacgaga 360

agcacaaggt gtacgcctgc gaggtgaccc accagggcct gagctccccc gtcaccaaga 420

gcttcaacag gggggagtgt tagggggccg tttaaacggg tggcatccct gtgacccctc 480

cccagtgcct ctcctggccc tggaagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaat 540

aaaattaagt tgcatcattt tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tggggtggag 600

gggggtggta tggagcaagg ggcaagttgg gaagacaacc tgtagggcct gcggggtcta 660

ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc actgcaatct ccgcctcctg 720

ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc cgagttgttg ggattccagg catgcatgac 780

caggctcacc taatttttgt ttttttggta gagacggggt ttcaccatat tggccaggct 840

ggtctccaac tcctaatctc aggtgatcta cccaccttgg cctcccaaat tgctgggatt 900

acaggcgtga accactgctc cacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg 960

tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt 1020

tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc 1080

tcccttttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg 1140

gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg 1200

agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct 1260

cggtctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg 1320

agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg 1380

tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc 1440

agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca 1500

tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc 1560

291

gcccagttcc gcccattctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc 1620

cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct 1680

aggcttttgc aaaaagctcc cggg 1704

<210> SEQ ID NO: 34
<211> Longitud: 1120
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Señal de IgG1 humano + constante de IgG1 humano

<400> Secuencia: 34
tgctagcgcc accatgaaac acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcag ctcccagatg 60

ggtgctgagc caggtgcaat tgtgcaggcg gttagctcag cctccaccaa gggcccaagc 120

gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctggcg gcacagccgc cctgggctgc 180

ctggtcaagg actacttccc cgaacccgtg accgtgagct ggaactcagg cgccctgacc 240

agcggcgtgc acaccttccc cgctgtcctg cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 300

gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 360

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 420

acatgcccac cctgcccagc acctgaactc ctgggggggac cctcagtctt cctcttcccc 480

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 540

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 600

cataatgcca agacaaagcc ccgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 660

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg ccagccccgg 780

gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 900

ggccagcccg agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcagggcaa cgtcttctca 1020

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacaccc agaagagcct ctccctgtct 1080

cccggcaaat gagatatcgg gcccgtttaa acgggtggca 1120

<210> SEQ ID NO: 35
<211> Longitud: 40
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador PCR de ADNc de región variable de cadena pesada del anticuerpo #32A1

<400> Secuencia: 35

aaagctgagc gaggtgcaaa ttttggagac tggaggaggc 40

<210> SEQ ID NO: 36
<211> Longitud: 39
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador PCR de ADNc de región variable de cadena pesada del anticuerpo #32A1

<400> Secuencia: 36
aaagctgagc tgactgtgac catgactcct tggccccag 39

<210> SEQ ID NO: 37
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador de secuenciación de ADNc de región variable de cadena pesada del anticuerpo #32A1

<400> Secuencia: 37
taatacgact cactataggg 20

<210> SEQ ID NO: 38
<211> Longitud: 42
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador de secuenciación de ADNc de región variable de cadena ligera del anticuerpo #32A1

<400> Secuencia: 38
aaacatatgg cgacattgtc ttgacccagt ctcctgcttt gg 42

<210> SEQ ID NO: 39
<211> Longitud: 37
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Iniciador de secuenciación de ADNc de región variable de cadena ligera del anticuerpo #32A1

<400> Secuencia: 39
aaacgtacgt ctcaattcca gcttggtgcc tccagcg 37

<210> SEQ ID NO: 40
<211> Longitud: 1413
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: cadena pesada quimérica de #32A1

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS

293

<222> Ubicación: (1)..(1413)

<400> Secuencia: 40

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gag gtg caa att ttg gag act gga gga ggc ttg gtg aag      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

ccc ggt ggt tcc ctg aga ctg tct tgt gca acg tct gga ttc aat ttc     144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aat gat tat ttc atg aac tgg gtc cgt cag gct cca gaa aag ggg cta     192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtt gct caa ata agg aac aaa att tat act tat gcc aca ttt     240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tat gcg gag tct ttg gaa ggc aga gtc aca atc tca cga gac gat tcc     288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                85                  90                  95

gaa agc agt gtc tac ctg caa gtg agc agt tta aga gct gaa gac act     336
Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc att tat tac tgt aca aga tcc cta act ggg gga gac tac ttt gat     384
Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc agc tca gcc tcc acc aag     432
Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc     480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc     528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc     576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg     624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac     672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc     720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa     768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255
```

```
ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa tga                                        1413
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> SEQ ID NO: 41
<211> Longitud: 470
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 41

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                85                  90                  95

Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met 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 Glu Glu Met 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
```

<210> SEQ ID NO: 42
<211> Longitud: 714
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Cadena ligera quimérica de #32A1

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(714)

<400> Secuencia: 42

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

ggc gca tat ggc gac att gtc ttg acc cag tct cct gct ttg gct gtg      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
            20                  25                  30

tct cta ggg cag agg gcc aca atc tcc tgt agg gcc agc caa agt gtc     144
Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
        35                  40                  45

act att tct gga tat agt ttt ata cac tgg tac caa cag aaa cca gga     192
Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
    50                  55                  60

cag caa ccc aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gcc tct ggg     240
Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65                  70                  75                  80

atc ccg gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc     288
Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                85                  90                  95

acc atc aat cct gtg cag gct gat gat att gca acc tat ttc tgt cag     336
Thr Ile Asn Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
            100                 105                 110

cag agt agg aaa tct ccg tgg acg ttc gct gga ggc acc aag ctg gaa     384
Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
        115                 120                 125

ttg aga cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc     432
Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
    130                 135                 140

gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat     480
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145                 150                 155                 160

aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc     528
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
                165                 170                 175

ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag     576
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
            180                 185                 190

gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac     624
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
        195                 200                 205

tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg     672
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
    210                 215                 220

agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt tag             714
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> SEQ ID NO: 43

298

<211> Longitud: 237
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 43

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

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

Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Asn Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
100 105 110

Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

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

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

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

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

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

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

299

225 230 235

<210> SEQ ID NO: 44
<211> Longitud: 5
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<400> Secuencia: 44

Asp Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> SEQ ID NO: 45
<211> Longitud: 19
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<400> Secuencia: 45

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

Leu Glu Gly

<210> SEQ ID NO: 46
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<400> Secuencia: 46

Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 47
<211> Longitud: 15
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<400> Secuencia: 47

Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 48
<211> Longitud: 7
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<400> Secuencia: 48

Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> SEQ ID NO: 49
<211> Longitud: 9
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

300

<400> Secuencia: 49

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> SEQ ID NO: 50
<211> Longitud: 1410
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T1H

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1410)

<400> Secuencia: 50

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gag gtg caa ctg gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg caa      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc gcc tcc ggc ttc aac ttc     144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga caa gcc cct ggc aag ggc ctg     192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc caa atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc     240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc     288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

aag aac agc ctg tac ctt caa atg aac tcc ctg aga gcc gag gac acc     336
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt gcc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac     384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc caa ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc tcc acc aag     432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc     480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc     528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc     576
```

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

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445
```

```
tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                         1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> SEQ ID NO: 51
<211> Longitud: 470
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 51

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln 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 Glu Glu Met 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
```

<210> SEQ ID NO: 52
<211> Longitud: 1410
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T2H

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1410)

<400> Secuencia: 52

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

gtg ctg agc gag gtg caa ctg gtg gag agc ggc ggc gga ctg gtg caa      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctg agc tgt gcc gcc tcc ggc ttc aac ttc     144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga caa gcc cct gag aag ggc ctg     192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc caa atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc     240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctg gag ggc aga gtg acc atc tcc aga gac aac gcc     288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

aag aac agc ctg tac ctg caa atg tcc tcc ctg aga gcc gag gac acc     336
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt gcc aga agc ctg acc ggc ggc gac tac ttc gac     384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc caa ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc tcc acc aag     432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc     480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc     528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175
```

```
gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
```

```
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                         1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> SEQ ID NO: 53
<211> Longitud: 470
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 53

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln 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 Glu Glu Met 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
```

<210> SEQ ID NO: 54
<211> Longitud: 1410
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T3H

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1410)

<400> Secuencia: 54

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

gtg ctg agc gag gtg cag atc gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg cag      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Ile Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc acc tcc ggc ttc aac ttc     144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga cag gcc cct gag aag ggc ctg     192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc cag atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc     240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga gtg acc atc tcc aga gac gac agc     288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                85                  90                  95

gag tcc agc gtg tac ctt cag atg tcc agc ctg aga gcc gag gac acc     336
Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt acc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac     384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc tcc acc aag     432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc     480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc     528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175
```

```
gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
```

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

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                             1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> SEQ ID NO: 55
<211> Longitud: 470
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 55

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Ile Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                85                  90                  95

Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln 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 Glu Glu Met 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
```

<210> SEQ ID NO: 56
<211> Longitud: 1410
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T5H

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1410)

<400> Secuencia: 56

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

gtg ctg agc gag gtg cag gtg gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg cag      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc acc tcc ggc ttc aac ttc     144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga cag gcc cct ggc aag ggc ctg     192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc cag atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc     240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aac agc     288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
                85                  90                  95

aag tcc acc gtg tac ctt cag atg aac tcc ctg aga gcc gag gac acc     336
Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt acc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac     384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc tcc acc aag     432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc     480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc     528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
```

313

```
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430
```

```
ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                             1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> SEQ ID NO: 57
<211> Longitud: 470
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 57

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
                85                  90                  95

Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln 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 Glu Glu Met 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

<210> SEQ ID NO: 58
<211> Longitud: 1410
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T6H

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1410)

<400> Secuencia: 58

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gag gtg cag gtg gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg cag      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc acc tcc ggc ttc aac ttc     144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga cag gcc cct gag aag ggc ctg     192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc cag atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc     240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga gtg acc atc tcc aga gac aac agc     288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
                85                  90                  95

aag tcc acc gtg tac ctt cag atg tcc agc ctt aga gcc gag gac acc     336
Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt acc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac     384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc cag ggc acc ctt gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc aag     432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc     480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc     528
```

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

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430
```

318

```
ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                             1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> SEQ ID NO: 59
<211> Longitud: 470
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 59

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
                85                  90                  95

Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln 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 Glu Glu Met 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


<210>  SEQ ID NO: 60
<211>  Longitud: 714
<212>  Tipo: ADN
<213>  Organismo: Secuencia artificial

<220>  Característica:
<223>  Otra información: h#32A1-T1L


<220>  Característica:
<221>  Nombre/Clave: CDS
<222>  Ubicación: (1)..(714)

<400>  Secuencia: 60
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg atg acc cag agc cct gac tcc ctt gcc      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc aac tgt aga gcc tcc cag agc     144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct     192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

ggc cag cct cct aag ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc     240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc gtg cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc     288
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc gtg tac tac tgt     336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc ggc ggc ggc acc aag gtg     384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc     432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg     480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160
```

```
aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt              714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> SEQ ID NO: 61
<211> Longitud: 238
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 61

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

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

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

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

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

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

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 62
<211> Longitud: 714
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T2L

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(714)

<400> Secuencia: 62

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg atg acc cag agc cct gac tcc ctt gcc      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc agc tgt aga gcc tcc cag agc     144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct     192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

ggc cag cct cct aga ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc     240
Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc gtg cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc     288
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc gtg tac ttc tgt     336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys
            100                 105                 110
```

```
cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc gcc ggc ggc acc aag gtg      384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg      480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt              714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> SEQ ID NO: 63
<211> Longitud: 238
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 63

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

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

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

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95
```

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125

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

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

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

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 64
<211> Longitud: 714
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T3L

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(714)

<400> Secuencia: 64

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

ggc gca tat ggc gac atc gtg ctt acc cag agc cct gac tcc ctt gcc 96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc agc tgt aga gcc tcc cag agc 144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct 192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

```
    50                  55                  60

ggc cag cag cct aga ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc      240
Gly Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc atc cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc      288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc acc tac ttc tgt      336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc gcc ggc ggc acc aag gtg      384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg      480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt              714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> SEQ ID NO: 65
<211> Longitud: 238
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 65

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

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

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
```

35 40 45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125

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

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

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

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 66
<211> Longitud: 711
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T4L

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(711)

<400> Secuencia: 66
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg ctt acc cag agc cct gcc ctt gcc gtg      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
            20                  25                  30

tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc agc tgt aga gcc tcc cag agc gtg     144
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
        35                  40                  45

acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct ggc     192
Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
    50                  55                  60

cag cag cct aga ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc ggc     240
Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65                  70                  75                  80

atc cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg     288
Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                85                  90                  95

acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc acc tac ttc tgt cag     336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
            100                 105                 110

cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc gcc ggc ggc acc aag ctg gag     384
Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
        115                 120                 125

atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc     432
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
    130                 135                 140

gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat     480
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145                 150                 155                 160

aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc     528
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
                165                 170                 175

ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag     576
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
            180                 185                 190

gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac     624
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
        195                 200                 205

tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg     672
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
    210                 215                 220

agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt                 711
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> SEQ ID NO: 67
<211> Longitud: 237
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 67

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

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

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

Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
100 105 110

Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 68
<211> Longitud: 714

<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T5L

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(714)

<400> Secuencia: 68

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg ctt acc cag agc cct gac tcc ctt gcc      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc aac tgt aga gcc tcc cag agc     144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct     192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

ggc cag cct cct aag ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc     240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc atc cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc     288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc acc tac tac tgt     336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg     384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc     432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg     480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac     528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc     576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc     624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc     672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
```

330

210 215 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> SEQ ID NO: 69
<211> Longitud: 238
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 69

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

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

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125

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

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

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

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala

195 200 205

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

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

<210> SEQ ID NO: 70
<211> Longitud: 714
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T6L

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(714)

<400> Secuencia: 70

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

ggc gca tat ggc gac atc gtg ctt acc cag agc cct gac tcc ctt gcc 96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc agc tgt aga gcc tcc cag agc 144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct 192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

ggc cag cct cct aga ctg ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc 240
Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

ggc atc cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc 288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc acc tac ttc tgt 336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
100 105 110

cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc gcc ggc ggc acc aag gtg 384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc 432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg 480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac 528

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

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt              714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> SEQ ID NO: 71
<211> Longitud: 238
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 71

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

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

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

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

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

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

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

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 72
<211> Longitud: 451
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T7H

<400> Secuencia: 72

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

```
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400
```

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 73
<211> Longitud: 451
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T8H

<400> Secuencia: 73

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

336

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 74
<211> Longitud: 451
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T9H

<400> Secuencia: 74

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

```
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445
```

Pro Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 75
<211> Longitud: 451
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T10H

<400> Secuencia: 75

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

```
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> SEQ ID NO: 76
<211> Longitud: 451
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T11H

<400> Secuencia: 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 77
<211> Longitud: 451
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: h#32A1-T12H

<400> Secuencia: 77

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255
```

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 78
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T7L

<400> Secuencia: 78

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

345

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 79
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T8L

<400> Secuencia: 79

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 80
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T9L

<400> Secuencia: 80

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 81
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T10L

<400> Secuencia: 81

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 82
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T11L

<400> Secuencia: 82

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

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 83
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T12L

<400> Secuencia: 83

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

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 84
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T13L

<400> Secuencia: 84

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

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 85
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T14L

<400> Secuencia: 85

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 86
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T15L

<400> Secuencia: 86

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

```
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> SEQ ID NO: 87
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T16L

<400> Secuencia: 87

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 88
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T17L

<400> Secuencia: 88

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

```
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> SEQ ID NO: 89
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T18L

<400> Secuencia: 89

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

```
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> SEQ ID NO: 90
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T19L

<400> Secuencia: 90

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

```
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> SEQ ID NO: 91
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T20L

<400> Secuencia: 91

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

```
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> SEQ ID NO: 92
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T21L

<400> Secuencia: 92

```
Glu Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15
```

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 93
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T22L

<400> Secuencia: 93

Glu Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

360

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
        35                  40                  45

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
                85                  90                  95

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> SEQ ID NO: 94
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T23L

<400> Secuencia: 94

```
Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15
```

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
        35                  40                  45

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
                85                  90                  95

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> SEQ ID NO: 95
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T24L

<400> Secuencia: 95

```
Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15
```

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> SEQ ID NO: 96
<211> Longitud: 218
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-T25L

<400> Secuencia: 96

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
        35                  40                  45

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
                85                  90                  95

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> SEQ ID NO: 97
<211> Longitud: 14
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Rattus norvegicus

<400> Secuencia: 97

```
Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala
1               5                   10
```

<210> SEQ ID NO: 98

<211> Longitud: 1398
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-H1-1

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1398)

<400> Secuencia: 98

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg       48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gaa gtc cag ctt gtg gaa agc gga ggg gga ctc gtt cag       96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cca gga ggc tct ctg cgc ctg tca tgc gct gcc agc gga ttt aat ttc      144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aat gat tat ttt atg aac tgg gtc agg cag gct ccg gga aaa ggg ctg      192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gaa tgg gtc gcc cag atc aga aac aag atc tat act tac gct aca ttc      240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gca tct gta aag ggg agg ttt aca att agt cgc gac aat gca      288
Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

aaa aat agt ctg tat ctc caa atg aac tcc ctc cgc gca gag gat act      336
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gct gtc tac tac tgc gcc agg tcc ttg act ggc ggc gac tat ttt gat      384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg gga cag ggc acc ctg gtg acg gtg agc tca gcc agc acc aag      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cct tcc gtg ttc cct ctg gcc cct tgt agc cgt tcc acc agc gag      480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145                 150                 155                 160

tcc acc gcc gcc ctt ggc tgt ctg gtg aag gac tac ttc cct gag cct      528
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tcc gga gcc ctt acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc cct gcc gtg ctg cag tcc agc ggc ctt tac tcc ctg agc tcc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg cct agc tcc aac ttc ggc acc caa acc tac acc tgt aac      672
```

```
Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
    210                 215                 220

gtg gac cac aag cct agc aac acc aag gtg gac aag acc gtg gag cgt      720
Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225                 230                 235                 240

aag tgt tgt gtg gag tgt cct cct tgt cct gcc cct cct gtg gcc gga      768
Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
                245                 250                 255

cct tcc gtg ttc ctt ttc cct cct aag cct aag gac acc ctg atg atc      816
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

agc cgt acc cct gag gtg acc tgt gtg gtg gtg gac gtg tcc cac gag      864
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

gac cct gag gtg cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac      912
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

aac gcc aag acc aag cct cgt gag gag caa ttc aac agc acc ttc cgt      960
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305                 310                 315                 320

gtg gtg tcc gtg ctt acc gtg gtg cac caa gac tgg ctg aac ggc aag     1008
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

gag tac aag tgt aag gtg agc aac aag gga ctt cct gcc cct atc gag     1056
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

aag acc atc tcc aag acc aag ggc caa cct cgt gag cct caa gtg tac     1104
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

acc ctt cct cct agc cgt gag gag atg acc aag aac caa gtg tcc ctt     1152
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

acc tgt ctg gtg aag ggc ttc tac cct agc gac atc gcc gtg gag tgg     1200
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

gag tcc aac gga caa cct gag aac aac tac aag acc acc cct cct atg     1248
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
                405                 410                 415

ctt gac agc gac ggc tcc ttc ttc ctg tac agc aag ctg acc gtg gac     1296
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430

aag tcc cgt tgg caa caa ggc aac gtg ttc agc tgt tcc gtg atg cac     1344
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

gag gcc ctg cac aac cac tac acc caa aag agc ctt tcc ctg agc cct     1392
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

gga aag                                                             1398
Gly Lys
465
```

<210> SEQ ID NO: 99
<211> Longitud: 466
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 99

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
35 40 45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65 70 75 80

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

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

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
245 250 255

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> SEQ ID NO: 100
<211> Longitud: 1398
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-H5

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(1398)

<400> Secuencia: 100

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg        48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gag gtg cag gtg gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg cag        96
Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc acc tcc ggc ttc aac ttc       144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga cag gcc cct ggc aag ggc ctg       192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc cag atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc       240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aac agc       288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
                85                  90                  95

aag tcc acc gtg tac ctt cag atg aac tcc ctg aga gcc gag gac acc       336
Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt acc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac       384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc agc acc aag       432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cct tcc gtg ttc cct ctg gcc cct tgt agc cgt tcc acc agc gag       480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145                 150                 155                 160

tcc acc gcc gcc ctt ggc tgt ctg gtg aag gac tac ttc cct gag cct       528
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tcc gga gcc ctt acc agc ggc gtg cac acc       576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc cct gcc gtg ctg cag tcc agc ggc ctt tac tcc ctg agc tcc gtg       624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205
```

```
gtg acc gtg cct agc tcc aac ttc ggc acc caa acc tac acc tgt aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
    210                 215                 220

gtg gac cac aag cct agc aac acc aag gtg gac aag acc gtg gag cgt      720
Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225                 230                 235                 240

aag tgt tgt gtg gag tgt cct cct tgt cct gcc cct cct gtg gcc gga      768
Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
                245                 250                 255

cct tcc gtg ttc ctt ttc cct cct aag cct aag gac acc ctg atg atc      816
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

agc cgt acc cct gag gtg acc tgt gtg gtg gtg gac gtg tcc cac gag      864
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

gac cct gag gtg cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac      912
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

aac gcc aag acc aag cct cgt gag gag caa ttc aac agc acc ttc cgt      960
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305                 310                 315                 320

gtg gtg tcc gtg ctt acc gtg gtg cac caa gac tgg ctg aac ggc aag     1008
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

gag tac aag tgt aag gtg agc aac aag gga ctt cct gcc cct atc gag     1056
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

aag acc atc tcc aag acc aag ggc caa cct cgt gag cct caa gtg tac     1104
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

acc ctt cct cct agc cgt gag gag atg acc aag aac caa gtg tcc ctt     1152
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

acc tgt ctg gtg aag ggc ttc tac cct agc gac atc gcc gtg gag tgg     1200
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

gag tcc aac gga caa cct gag aac aac tac aag acc acc cct cct atg     1248
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
                405                 410                 415

ctt gac agc gac ggc tcc ttc ttc ctg tac agc aag ctg acc gtg gac     1296
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430

aag tcc cgt tgg caa caa ggc aac gtg ttc agc tgt tcc gtg atg cac     1344
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

gag gcc ctg cac aac cac tac acc caa aag agc ctt tcc ctg agc cct     1392
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

gga aag                                                             1398
Gly Lys
```

465

<210> SEQ ID NO: 101
<211> Longitud: 466
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 101

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
35 40 45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn

210 215 220

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

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
245 250 255

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> SEQ ID NO: 102
<211> Longitud: 714
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-L2-15

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(714)

<400> Secuencia: 102

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc       48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

ggc gca tat ggc gaa att ctg atg acg cag agt cct gca act ctt agt       96
Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
            20                  25                  30

ctg tca cct ggc gag aga gcc aca ctc agc tgc cga gcg tcc cag tcc      144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc att agc ggc tat tct ttt att cat tgg tat cag caa aag cct      192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

gga cag gcg cca agg ctg ctc att tac aga gca agc aac ctt gcc tct      240
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc att cca gca aga ttc agc ggg agc gga tca ggg aca gat ttc acc      288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ttg acc atc tcc tcc ctg gag ccg gag gat ttc gcg ttg tat tat tgt      336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

cag caa tct agg aag agt cca tgg aca ttt ggc cag ggc acc aaa gtg      384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg      480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205
```

```
gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt            714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> SEQ ID NO: 103
<211> Longitud: 238
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 103

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Leu Met 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 Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

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

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

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

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190
```

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 104
<211> Longitud: 714
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: h#32A1-L2-16

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: CDS
<222> Ubicación: (1)..(714)

<400> Secuencia: 104

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

ggc gca tat ggc gaa atc ctg atg aca cag agt cct gcg acc ctc tcc      96
Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
            20                  25                  30

ctc tca cca ggc gag agg gcc acc ctg tct tgt aga gcc agc cag tca     144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtc act att agt gga tac tca ttt atc cat tgg tat caa cag aaa cca     192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

gga cag gcg cct cgg ctt ctg atc tac cgc gcc tca aac ctt gcc tct     240
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc atc ccc gcg agg ttc tct ggc tct ggc agc ggt acc gat ttt aca     288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg act atc tca agc ctc gaa cct gaa gac ttc gca ctg tac ttt tgc     336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

cag cag agc agg aag tcc ccc tgg act ttt gca cag gga acc aaa gtc     384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gaa atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc     432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg     480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
```

```
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt              714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> SEQ ID NO: 105
<211> Longitud: 238
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Construcción sintética

<400> Secuencia: 105

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Leu Met 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 Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
```

130 135 140

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

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

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

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

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

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

<210> SEQ ID NO: 106
<211> Longitud: 1111
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Secuencia artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Péptido de señal que codifica la secuencia de ácido nucleico y región constante de cadena pesada de IgG2 humano

<400> Secuencia: 106
aagcttgcta gcgccaccat gaaacacctg tggttcttcc tcctgctggt ggcagctccc 60

agatgggtgc tgagccaggt gcaattgtgc aggcggttag ctcagccagc accaagggcc 120

cttccgtgtt ccctctggcc ccttgtagcc gttccaccag cgagtccacc gccgcccttg 180

gctgtctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgaccgt gagctggaac tccggagccc 240

ttaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc cagcggcctt tactccctga 300

gctccgtggt gaccgtgcct agctccaact tcggcaccca aacctacacc tgtaacgtgg 360

accacaagcc tagcaacacc aaggtggaca agaccgtgga gcgtaagtgt tgtgtggagt 420

gtcctccttg tcctgccccc cctgtggccg gaccttccgt gttccttttc cctcctaagc 480

ctaaggacac cctgatgatc agccgtaccc ctgaggtgac ctgtgtggtg gtggacgtgt 540

cccacgagga ccctgaggtg cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaacg 600

ccaagaccaa gcctcgtgag gagcaattca acagcacctt ccgtgtggtg tccgtgctta 660

ccgtggtgca ccaagactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaaggtg agcaacaagg 720

gacttcctgc ccctatcgag aagaccatct ccaagaccaa gggccaacct cgtgagcctc 780

aagtgtacac ccttcctcct agccgtgagg agatgaccaa gaaccaagtg tcccttacct 840

gtctggtgaa gggcttctac cctagcgaca tcgccgtgga gtgggagtcc aacggacaac 900

337

ctgagaacaa ctacaagacc acccctccta tgcttgacag cgacggctcc ttcttcctgt 960

acagcaagct gaccgtggac aagtcccgtt ggcaacaagg caacgtgttc agctgttccg 1020

tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccaaaagag cctttccctg agccctggaa 1080

agtgatatcg ggcccgttta aacgggtggc a 1111

SGD\SGD\ID-260973\WPC15869

Notaría Sexta 6

DEL CIRCULO DE BOGOTA,

COPIA NUMERO 12

DE LA ESCRITURA NUMERO: 1039
FECHA: 25/Febrero/2010

ACTO O CONTRATO:
REVOCACION DE PODER,PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
CHAVARRO ARISTIZABAL JORGE y otros

ICONTEC
CERTIFICADO DE GESTION DE LA CALIDAD
CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL SERVICIO PUBLICO NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000

CERTIFIED IQNet MANAGEMENT SYSTEM

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notariasexta@etb.net.co

7 700004 335964

ESCRITURA PUBLICA NUMERO - - -1039 - - - - -

- - - - - -MIL TREINTA Y NUEVE - - - - - - - - -

DE FECHA: FEBRERO VEINTICINCO (25) - - - - - - -

DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2.010) - - - - - - - - -

OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6a) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. ----------

CLASE DE ACTO O CONTRATO: **PODER ESPECIAL** y **REVOCATORIA** ----------

DE: **CAVELIER ABOGADOS** ----------

A : **LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, NIDIA OSORIO LÓPEZ, OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA, EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY y JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL** ----------

En la ciudad de Bogotá D.C. República de Colombia, ante mí, AMPARO QUINTERO ARTURO Notaria sexta (6a.) de éste círculo notarial, se otorgó la presente escritura pública que se consigna en los siguientes términos: ----------

COMPARECENCIA: Con minuta escrita, compareció el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, mayor de edad, vecino de esta ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 19.066.425 de Bogotá, y dijo:----------

ESTIPULACIONES: ----------

PRIMERA.- Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la **Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.** ----------

SEGUNDA: Que **DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED,** sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón, domiciliada en 3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokio 103-8426, Japón, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. ----------

TERCERA.- Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED,** confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ,** T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número 39.787.682 de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA**

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

IMPRESO EN DICIEMBRE 1° DE 2009 POR POLYPRINT EDITORIAL LTDA - NIT 830 029 959-5

BARBOSA, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número 52.006.265 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos:----------

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos ----------

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso- administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. ----------

CUARTO.- Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. ----------

QUINTO- Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día **02 de Noviembre de 2009** ----------
por **DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED,** documento que está debidamente

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, D. C. - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

domiciliado (s)
en/of 3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo103-8426, Japan

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir,

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the

© CAVELIER ABOGADOS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
17 DIC. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ, D.C.
HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
25 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 2nd day of November, 2009

En/in Tokyo

Por/by Kazuo Sato

General Manager, Intellectual Property

Firma/Signature

Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía, autenticado ante Notario Público y legalizado*.

El Notario deberá certificar: i) que la compañía existe; ii) que ejerce su objeto social; y iii) que la persona que firma está autorizada para otorgar este documento.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante: El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document ought to be signed by the legal representative of the company, notarized and legalized*.

The Notary Public must certify: i) that the company legally exists; ii) that it is in exercise of its corporate purposes; and iii) that the person who signs the Representation document is authorized to do so.

* Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

© CAVELIER ABOGADOS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
17 DIC. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
25 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIAL CERTIFICATE Registration No 1755

This is to certify that the signature on the foregoing document is genuine and authentic signature of Kazuo Sato, General Manager, Intellectual Property of DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, a corporation existing and organized under the laws of Japan, who has produced sufficient proof of his power to execute the said instrument on behalf of the above-mentioned corporation.

NOV - 2 2009

TOKYO LEGAL AFFAIRS BUREAU
NOTARY
2-2-2, UCHISAIWAICHO
CHIYODA-KU
TOKYO JAPAN

TADAHIKO MITSUDA
NOTARY

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
17 DIC. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
25 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

平成２１年登簿第　　1755号

認　　証

嘱託人第一三共株式会社知的財産部長佐藤一雄の代理人城野喬は、本公証人に対し、嘱託人が別添文書に署名したことを自認している旨陳述した。

よって、これを認証する。

平成２１年　11　月　2　日、本公証人役場において

東京都千代田区内幸町２丁目２番２号

東京法務局所属

公証人
Notary

満田忠彦
TADAHIKO MITSUDA

証　　明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成２１年 11 月 2 日

東京法務局長　山浦弥一郎

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN
   This public document
2. has been signed by TADAHIKO MITSUDA
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of TADAHIKO MITSUDA, NOTARY
   Certified
5. at Tokyo
6. NOV – 2 2009
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 09- Nº 002049
9. Seal/stamp:
10. Signature

Kazutoyo OYABE
For the Minister for Foreign Affairs

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
25 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
17 DIC. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TRADUCCIÓN OFICIAL 342/2009 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL **DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED**. DOMICILIADA EN 3-5-1, NIHONBASHI HONCHO, CHUO-KU, TOKIO 103-8426, JAPÓN, OTORGA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS RELACIONADOS CON PROPIEDAD INDUSTRIAL A **CAVELIER ABOGADOS**.

DADO Y FIRMADO HOY 2 DE NOVIEMBRE DE 2009 EN TOKIO POR KAZUO SATO, GERENTE GENERAL, PROPIEDAD INTELECTUAL. FIRMA: ILEGIBLE.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

REGISTRO NO 1755

Por la presente certifico que la firma sobre el documento precedente es la firma genuina y auténtica de KAZUO SATO, gerente general, Propiedad Intelectual de DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, una sociedad constituida y existente de conformidad con las leyes del Japón, quien ha presentado prueba suficiente de su poder para firmar dicho documento a nombre de la sociedad arriba mencionada. 2009. Firmado: TADAHIKO MITSUDA, notario

SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO NOTARIO. 2-2-2, UCHISAIWAICHO, CHIYODA-KU, TOKIO, JAPON.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
17 DIC. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: JAPÓN

Eduardo C...

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
25 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

2. Este documento público ha sido firmado por TADAHIKO MITSUDA

3. quien actúa en su calidad de notario de la oficina de asuntos jurídicos de TOKIO.

4. lleva el sello/estampilla de TADAHIKO MITSUDA, NOTARIO

CERTIFICADO

5. En TOKIO 6. el 2 de noviembre de 2009

7. Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. 09- No. 002049

9. Sello/estampilla: MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPÓN

10. Firma: KAZUTOYO OYABE, A NOMBRE DEL MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES

COLO-15869-841-017-8

ECN\ECN\ID-162614\WPCL002G

Bogotá, 14 de diciembre de 2009.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA
17 DIC. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA
25 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

383

01

88226885

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009 HORA 11:11:00

R027136832 PAGINA: 1 de 3

* *

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII,LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA).-.

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO.129.337

NOTARIA SEXTA BOGOTÁ

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
25 FEB. 2010
ARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO.INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

CERTIFICA:

LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA PROFESION LIBERAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO SOCIAL PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: $10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE $1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIO CAPITALISTA (S)

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO N.I.T. 000008001722568

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PUESTO A LA VISTA. BOGOTA D.C. - REPUBLICA DE COLOMBIA
25 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

01

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009 HORA 11:11:00

R027136832 PAGINA: 2 de 3

* *

NO. CUOTAS: 8,800.00 VALOR: $8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00 VALOR: $1,200.00
- SOCIO INDUSTRIAL (S)
CHAVARRO JORGE C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
PEÑA VALENZUELA DANIEL C.C. 000000079518915
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO C.C. 000000079155665
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
TOTALES
NO. CUOTAS: 10,000.00 VALOR: $10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONS CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009, INSCRITA EL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE IDENTIFICACION

DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO)

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

25 FEB. 2010

PABLO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

GALLON GIRALDO CARLOS C.C. 000000019066425

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
CAVELIER GAVIRIA GERMAN	C.C. 000000002877924
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO	C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE [illegible] GUBERNATIVA.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

25 FEB. 2010

[illegible] QUINTERO ARTURO
NOTARIA

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

[illegible] DE LA CAMARA DE COMERCIO,

****
****
****
****
****
****
****
****
****
****

01 *88226887*

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009 HORA 11:11:00

R027136832 PAGINA: 3 de 3

* *

VALOR : $ 3,500

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
25 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

386

7 700004 335957

legalizado ----------

Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública y que en consecuencia revoca la escritura número seis mil setecientos noventa y seis (6796) del diecisiete (17) de Diciembre de dos mil nueve (2009) otorgada ante esta misma notaría. ----------

---------- **HASTA AQUÍ LA MINUTA PRESENTADA** ----------

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION: LEIDA la presente escritura por los comparecientes y habiéndoseles hecho las advertencias sobre los trámites y formalidades de rigor le impartieron su aprobación y para constancia la firman ante mí el NOTARIO QUE AUTORIZA ----------

DERECHOS NOTARIALES: $ 85.720.oo - - - - - - - - - - - - - - -

IVA 16% $ 22.486.oo -

PAPEL NOTARIAL: esta escritura ha quedado extendida en las hojas de papel sellado notarial números: ----------

7-700004-335964 - 7-700004-335957 - - - - - - - - - - - - - - - - -

EN BLANCO... EN BLANCO

OTORGANTE

CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO

C.C. 19.066.425 BTA

TEL 3473611

REPRESENTANTE LEGAL DE **CAVELIER ABOGADOS**

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arturo
NOTARIA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA SEXTA (6a) DE BOGOTA D.C.

T1063/10.PG.ANGELIK

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

IMPRESO EN DICIEMBRE 1° DE 2009 POR POLYPRINT EDITORIAL LTDA - NIT 830 029 959-5

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

ES FIEL Y DECIMA SEGUNDA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1039 DE FECHA FEBRERO 25 DE 2010. QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO. EN 08 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES CONFORME A LA LEY.

BOGOTA D.C.JUNIO 29 DE 2011

RESOLUCION 01 DE 2008

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

AMPARO QUINTERO ARTURO.

NOTARIA SEXTA.

387

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0021750

Bogotá D.C., Febrero 25 de 2014 - 16:49:03

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	651483932	25/02/2014	19.213.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1603 INVOCAR LA NOTORIEDAD DENTRO DE UN TRAMITE DE OPOSICION	464.000.00	464.000.00
				$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-085127- -00010-0000
Fecha: 2014-02-27 14:57:46 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 388

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-041955- -00000-0000
Fecha: 2014-02-27 14:57:46 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 388

COD: 15869-841-044-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0021987

Bogotá D.C., Febrero 26 de 2014 - 12:21:23

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	14796	07/02/2014		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	14797	07/02/2014		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	16092	12/02/2014		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	16093	12/02/2014		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	20793	24/02/2014		422.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
14	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	434.000.00
				$434.000.00

SON: **CUATROCIENTOS TREINTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-085127- -00010-0000
Fecha: 2014-02-27 14:57:46 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 388

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-041955- -00000-0000
Fecha: 2014-02-27 14:57:46 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 388

Cod: 15869.- 841-044-2.