

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-275282- -00000-0000

Fecha: 2013-11-22 15:32:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 284

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: ANTICUERPO ANTI-B7-H3

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL C12N 15/09

71. SOLICITANTE: DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

DOMICILIO: Tokyo, Japón

74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-275282- -00000-0000 Fecha: 2013-11-22 15:32:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 284
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/JP2012/060904	Fecha 24 de Abril de 2012
	Publicación Internacional No.	WO 2012/147713 A1	Fecha 01 de Noviembre de 2012
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
	ANTICUERPO ANTI-B7-H3		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C12N 15/09		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
	DAIICHI SANKYO COMPANY,LIMITED		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN: 3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku,		No. TELÉFONO:
	CIUDAD: Tokyo 103-8426,		CORREO ELECTRONICO:
	PAÍS DE RESIDENCIA: Japón		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Japón
7	INVENTOR (ES) VER HOJA INFORMACION COMPLEMENTARIA		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	DIRECCIÓN	CIUDAD	PAÍS RESIDENCIA
	OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)		
	☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
	APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
	LÓPEZ DÍAZ	SILVANA MARIA	C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ
	DIRECCIÓN	Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6	No. TELÉFONO 6181088
	CIUDAD	Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO
	PAÍS	Colombia	notificaciones@clarkemodet.com.co
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
	1.Japón	JP	2011-097645
	2.Estados Unidos de América	US	61/478.878
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2011/04/25
			2011/04/25

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 13-112408/ 13-119574	Fecha 05/11/2013 22/11/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción 2. ☒ Reivindicaciones 3. ☒ Dibujos y/o figuras 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.		9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

ANEXO INVENTORES

1.) TAKAHASHI, Shu

(C/o Daiichi Sankyo Company, Limited, 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokio 134-8630, Japón);

2.) MATSUOKA, Tatsuji

(C/o Daiichi Sankyo Company, Limited, 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokio 134-8630, Japón);

3.) MURAKAMI, Kenji

(C/o Daiichi Sankyo Company, Limited, 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokio 134-8630, Japón);

4.) TAKIZAWA, Takeshi

(C/o Daiichi Sankyo Company, Limited, 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokio 134-8630, Japón);

5.) HIROTANI, Kenji

(C/o Daiichi Sankyo Company, Limited, 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokio 134-8630, Japón);

6.) URANO, Atsushi

(C/o Daiichi Sankyo Company, Limited, 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokio 134-8630, Japón);

7.) FUKUCHI, Keisuke

(C/o Daiichi Sankyo Company, Limited, 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokio 134-8630, Japón);

8.) YAZAWA, Mitsuhiro

(C/o Daiichi Sankyo Company, Limited, 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokio 134-8630, Japón).

ANTICUERPO ANTI-B7-H3**Campo de la Invención**

La invención actual se refiere a un anticuerpo que se enlaza a B7-H3 y es útil como un agente terapéutico y/o preventivo para un tumor, y también se refiere a un método para tratar y/o prevenir un tumor usando el anticuerpo.

Antecedentes de la Invención

La B7-H3 es una proteína que tiene una estructura de transmembrana de paso sencillo (Documento no de patente 1). El dominio extracelular de N-terminal de B7-H3 contiene dos variantes. La Variante 1 contiene un dominio tipo V y un dominio Ig tipo C, respectivamente, en cada uno de dos sitios, y la Variante 2 contiene un dominio tipo V y un dominio Ig tipo C, respectivamente, en un sitio. El dominio intracelular de C-terminal de B7-H3 contiene 45 aminoácidos.

Como un receptor para B7-H3, se ha reportado TLT-2 que tiene una estructura de transmembrana de paso sencillo (Documento no de patente 2). Sin embargo, también hay un reporte que insiste que TLT-2 no es un receptor para B7-H3 (Documento no de patente 3). De acuerdo con el receptor anterior, la activación de células T positivas en CD8 se aumenta cuando el receptor se enlaza a B7-H3.

Se ha reportado clínicamente que B7-H3 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, particularmente en cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer renal, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios, y cáncer pancreático (Documentos No de Patente 4 hasta 11). Además, se ha reportado que en el cáncer de próstata, la intensidad de la expresión de B7-H3 se correlaciona positivamente con

malignidades clinicopatológicas tales como volumen del tumor, invasión extraprostática, o registro Gleason, y también se correlaciona con el progreso del cáncer (Documento no de patente 8). Similarmente, en glioblastoma multiforme, la expresión de B7-H3 se correlaciona negativamente con supervivencia libre del evento (Documento no de patente 9), y en cáncer pancreático, la expresión de B7-H3 se correlaciona con metástasis de ganglio linfático y progreso patológico (Documento no de patente 11). En cáncer de ovarios, la expresión de B7-H3 se correlaciona con metástasis de ganglio linfático y progreso patológico.

Además, se ha reportado que al introducir siARN contra el gen B7-H3 en una línea de célula de cáncer positiva a B7-H3, se reduce la capacidad de adhesión a fibronectina reduciendo de esta manera la migración celular e invasión de matrigel (Documento no de patente 12). Además, se ha reportado que en el glioblastoma multiforme, la expresión de B7-H3 permite el escape de muerte celular mediada por célula NK (Documento no de patente 13).

Por otro lado, se ha reportado que B7-H3 se expresa no sólo en células de cáncer, sino también en tumores o vasos circundantes (Documentos No de Patente 5 and 14). Se ha reportado que cuando se expresa B7-H3 en vasos sanguíneos de cáncer de ovarios, se reduce la relación de supervivencia.

Las moléculas de la familia B7 se ha sugerido que están relacionadas al sistema inmunitario. Se ha reportado que B7-H3 se expresa en monocitos, células dendríticas, y células T activadas (Documento no de patente 15). Se ha reportado que conforme se activan las células T citotóxicas, B7-H3 coestimula la proliferación de células T positivas en CD4 o

positivas en CD8. Sin embargo, también se ha reportado que B7-H3 no juega un papel coestimulador (Documento no de patente 1).

Las moléculas B7-H3 se han reportado que están relacionadas con enfermedades autoinmunitarias. Se ha reportado que en reumatismos y otras enfermedades autoinmunitarias, B7-H3 juega un papel importante en la interacción entre sinoviocitos tipo fibroblasto y células T activadas (Documento no de patente 16) y que B7-H3 funciona como un factor coestimulador cuando las citoquinas se liberan de macrófagos activados y por lo tanto se relaciona a la presencia de sepsis (Documento no de patente 17). Además, se ha reportado que al administrar un anticuerpo anti-B7-H3 a un modelo de ratón de asma durante la fase de inducción, se mejora el asma debido a la supresión de producción de citoquina mediada por célula Th2 en ganglios linfáticos regionales a través de la administración de un anticuerpo B7-H3 anti-ratón (Documento no de patente 18).

Con respecto a B7-H3, se ha reportado que un anticuerpo contra B7-H3 de ratón aumenta las células T positivas en CD8 infiltradas intratumorales y suprime el crecimiento del tumor (Documento no de patente 24). Además, es una patente que describe que un anticuerpo que reconoce la variante 1 B7-H3 exhibe un efecto antitumor *in vivo* en adenocarcinoma (Documento de Patente 1).

A pesar de estos estudios, un epítipo para un anticuerpo anti-B7-H3 que exhibe un efecto anti-tumor *in vivo* no se ha clarificado aún, y no se ha reportado que una secuencia de aminoácidos específica del dominio extracelular de B7-H3 sea útil como un epítipo para un anticuerpo

monoclonal para tratar el cáncer.

Aún si se especifican los anticuerpos para el mismo antígeno, las propiedades de los anticuerpos pueden variar debido a las diferencias en epítomos o secuencias de los anticuerpos. Debido a las diferencias en las propiedades de los anticuerpos, cuando se ha demostrado clínicamente para humanos, los anticuerpos exhiben diferentes reacciones en términos de la efectividad del agente medicinal, la frecuencia de respuesta terapéutica, la incidencia de efectos colaterales o resistencia al fármaco, etc.

También con respecto a los anticuerpos contra B7-H3, se ha demandado fuertemente la creación de un anticuerpo que tiene propiedades sin precedentes.

Documentos de la Técnica Relacionada

Documento de Patente

Documento de Patente 1: WO 2008/066691

Documentos No de Patente

Documento no de patente 1: The Journal of Immunology, 2004, vol. 172, pp. 2352-2359

Documento no de patente 2: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, vol. 105, pp. 10495-10500

Documento no de patente 3: European Journal of Immunology, 2009, vol. 39 pp. 1754-1764

Documento no de patente 4: Lung Cancer, 2009, vol. 66, pp. 245-249

Documento no de patente 5: Clinical Cancer Research, 2008, vol. 14, pp. 5150-5157

Documento no de patente 6: Clinical Cancer Research 2008, vol. 14, pp. 4800-4808

Documento no de patente 7: Cancer Immunology, Immunotherapy, 2010, vol. 59, pp. 1163-1171

Documento no de patente 8: Cancer Research, 2007, vol. 67, pp. 7893-7900

5 Documento no de patente 9: Histopathology, 2008, vol. 53, pp. 73-80

Documento no de patente 10: Modern Pathology, 2010, vol. 23, pp. 1104-1112

10 Documento no de patente 11: British Journal of Cancer, 2009, vol. 101, pp. 1709-1716

Documento no de patente 12: Current Cancer Drug Targets, 2008, vol. 8, pp. 404-413

15 Documento no de patente 13: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, vol. 101, pp. 12640-12645

Documento no de patente 14: Modern Pathology, 2010, vol. 23, pp. 1104-1112

Documento no de patente 15: Nature Immunology, 2001, vol. 2, pp. 269-274

20 Documento no de patente 16: The Journal of Immunology, 2008, vol. 180, pp. 2989-2998

Documento no de patente 17: The Journal of Immunology, 2010, vol. 185, pp. 3677-3684

25 Documento no de patente 18: The Journal of Immunology, 2008, vol. 181, pp. 4062-4071

Sumario de la Invención

Problemas a Solucionarse por la Invención

Un objetivo de la invención es proporcionar un anticuerpo y un fragmento funcional del anticuerpo a usarse en un fármaco que tiene un efecto terapéutico en un

tumor, un método para tratar el tumor usando el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, y similares.

Medios para Solucionar los Problemas

Los inventores actuales hacen estudios intensivos con objeto de alcanzar el objetivo anterior, y como resultado, encuentran un anticuerpo que se enlaza específicamente a B7-H3 para exhibir una actividad antitumor, y de esta manera se completa la invención. Esto es, la invención incluye las siguientes invenciones.

(1) Un anticuerpo caracterizado porque tiene las siguientes propiedades de:

(a) enlazarse específicamente a B7-H3;

(b) que tiene una actividad de fagocitosis mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCP, por sus siglas en inglés); y

(c) que tiene una actividad antitumor *in vivo*, o un fragmento funcional del anticuerpo.

(2) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el anterior (1), en donde B7-H3 es una molécula que incluye una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6 o 10.

(3) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el anterior (1) o (2), que se enlaza a IgC1 y/o IgC2 cada uno de los cuales es un dominio de B7-H3.

(4) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el anterior (3), en donde IgC1 es un dominio que incluye una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 140 hasta 244 en SEQ ID NO: 6, e IgC2 es un dominio que incluye una secuencia de

aminoácidos representada por aminoácidos números 358 hasta 456 en la SEQ ID NO: 6.

5 (5) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1) hasta (4), que tiene una actividad inhibidora competitiva contra el anticuerpo M30 para el enlace a B7-H3.

10 (6) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1) hasta (5), que tiene una actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés) y/o una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés).

15 (7) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1) hasta (6), en donde el tumor es cáncer.

20 (8) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el anterior (7), en donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer hepático, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer del estómago, cáncer del esófago, o cáncer renal.

25 (9) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1) hasta (8), que comprende CDRH1 que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92, CDRH2 que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 93, y CDRH3 que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 94 como regiones complementariamente determinantes de la cadena pesada y comprende CDRL1 que consiste de una secuencia de aminoácidos

representada por SEQ ID NO: 95, CDRL2 que consiste de una
secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 96, y
CDRL3 que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 97 como regiones
complementariamente determinantes de la cadena ligera.

5

(10) El anticuerpo o un fragmento funcional del
anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1)
hasta (9), que comprende una región variable de cadena pesada
que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por
aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 51 y una
región variable de cadena ligera que consiste de una
secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números
23 hasta 130 en la SEQ ID NO: 53.

10

15

(11) El anticuerpo o un fragmento funcional del
anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1)
hasta (10), en donde la región constante es una región
constante derivada de humano.

20

(12) El anticuerpo o un fragmento funcional del
anticuerpo de acuerdo con el anterior (11), que comprende una
cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 63 y una cadena ligera que
consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ
ID NO: 59.

25

(13) El anticuerpo o un fragmento funcional del
anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1)
hasta (12), que está humanizada.

(14) El anticuerpo o un fragmento funcional del
anticuerpo de acuerdo con el anterior (13), que comprende:
una región variable de cadena pesada que consiste de una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste

de (a) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85, (b) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 87, (c) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 89, (d) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 91, (e) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% o más con cualquiera de las secuencias (a) hasta (d), y (f) una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos se eliminan, sustituyen o agregan en cualquiera de las secuencias (a) hasta (d); y una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de (g) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 71, (h) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 73, (i) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 75, (j) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 77, (k) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 79, (l) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 81, (m) una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 83, (n) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% o más con cualquiera de las secuencias (g) hasta (m), and (o) una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos se eliminan,

sustituyen o agregan en cualquiera de las secuencias (g) hasta (m).

(15) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el anterior (14), que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de
5 cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de: una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región variable de
10 cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 71; una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región
15 variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 73; una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una
20 región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 75; una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ
25 ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 77; una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste

de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos
números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 79; una región variable
de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ
ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste
de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos
números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 81; una región variable
de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ
ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste
de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos
números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 83; una región variable
de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ
ID NO: 91 y una región variable de cadena ligera que consiste
de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos
números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 71; una región variable
de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ
ID NO: 91 y una región variable de cadena ligera que consiste
de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos
números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 73; una región variable
de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por aminoácidos números 20 hasta 141 en la SEQ
ID NO: 91 y una región variable de cadena ligera que consiste
de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos
números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 75; y una región
variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de
aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 141
en la SEQ ID NO: 91 y una región variable de cadena ligera

que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 77.

(16) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con el anterior (14) o (15), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de: una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 75; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 77; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 79; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ

ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 81; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 83; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 75; y una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por aminoácidos números 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 77.

(17) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los anteriores (14) hasta (16), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de: una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos

representada por SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que
consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ
ID NO: 71; una cadena pesada que consiste de una secuencia de
aminoácidos representada por SEQ ID NO: 85 y una cadena
5 ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que
consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ
ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia
de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 75; una cadena
10 pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que
consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ
ID NO: 77; una cadena pesada que consiste de una secuencia de
aminoácidos representada por SEQ ID NO: 85 y una cadena
15 ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 79; una cadena pesada que
consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ
ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia
de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81; una cadena
20 pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que
consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ
ID NO: 83; una cadena pesada que consiste de una secuencia de
aminoácidos representada por SEQ ID NO: 91 y una cadena
25 ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que
consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ
ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia
de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 73; una cadena
pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos

representada por SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que
consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ
ID NO: 75; y una cadena pesada que consiste de una secuencia
de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 91 y una cadena
ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 77.

(18) El fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo
con cualquiera de los anteriores (1) hasta (17), en donde el
fragmento funcional es seleccionado del grupo que consiste de
Fab, F(ab)₂, Fab' y Fv.

(19) Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un
fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera
de los anteriores (1) hasta (18).

(20) El polinucleótido de acuerdo con el anterior (19),
que comprende una secuencia de nucleótido representada por
nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 50 y una
secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números
67 hasta 390 en la SEQ ID NO: 52.

(21) El polinucleótido de acuerdo con el anterior (19)
o (20), que incluye una secuencia de nucleótido representada
por SEQ ID NO: 62 y una secuencia de nucleótido representada
por SEQ ID NO: 58.

(22) El polinucleótido de acuerdo con el anterior (19)
o (20), que comprende: una secuencia de nucleótido
seleccionada del grupo que consiste de (a) una secuencia de
nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423
en la SEQ ID NO: 84, (b) una secuencia de nucleótido
representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ
ID NO: 86, (c) una secuencia de nucleótido representada por
nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 88, (d) una

secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90, y (e) una secuencia de nucleótido que comprende un polinucleótido que hibridiza un polinucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a) hasta (d) bajo condiciones severas; y una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de (f) una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 70, (g) una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 72, (h) una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 74, (i) una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 76, (j) una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 78, (k) una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 80, (l) una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 82, y (m) una secuencia de nucleótido que comprende un polinucleótido que hibridiza a un polinucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos (f) hasta (l) bajo condiciones severas.

(23) El polinucleótido de acuerdo con el anterior (22), que comprende secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de: una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido

representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 74; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 76; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 78; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 80; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 and una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 82; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ

ID NO: 74; y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 76.

(24) El polinucleótido de acuerdo con el anterior (22) o (23), que comprende secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de: una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 74; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 76; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 78; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 80; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699

en la SEQ ID NO: 82; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 74; y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por nucleótidos números 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 76.

(25) El polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los anteriores (22) hasta (24), que comprende secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de: una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 74; una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 76; una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 78; una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 80; una

secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 84 y una
secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 82; una
secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 90 y una
secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 70; una
5 secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 90 y una
secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 72; una
secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 90 y una
secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 74; y una
secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 90 y una
10 secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 76.

(26) Un vector de expresión que incluye un
polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los anteriores
(19) hasta (25).

(27) Una célula hospedera, que se transforma con el
vector de expresión de acuerdo con el anterior (26).

(28) La célula hospedera de acuerdo con el anterior
(27), en donde la célula hospedera es una célula eucariota.

(29) Un método para producir un anticuerpo o un
fragmento funcional del anticuerpo, caracterizado porque
incluye una etapa de cultivar la célula hospedera de acuerdo
20 con el anterior (27) o (28) y una etapa de coleccionar un
anticuerpo deseado o un fragmento funcional del anticuerpo a
partir de un producto cultivado obtenido en la etapa de
cultivado.

(30) Un anticuerpo o un fragmento funcional del
25 anticuerpo, caracterizado porque se obtiene por el método de
producción de acuerdo con el anterior (29).

(31) El fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo
con el anterior (30), en donde el fragmento funcional es
seleccionado del grupo que consiste de Fab, F(ab)₂, Fab' y

Fv.

(32) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1) hasta (18), (30), y (31), en donde la modificación de un glicano se regula para aumentar una actividad citotóxica celular dependiente del anticuerpo.

(33) Una composición farmacéutica caracterizada porque incluye al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con el anterior (1) hasta (18), y (30) hasta (32).

(34) La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior (33), que es para tratar el tumor.

(35) Una composición farmacéutica para tratar el tumor caracterizada porque incluye al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con el anterior (1) hasta (18), y (30) hasta (32) y al menos un agente terapéutico para el cáncer.

(36) La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior (34) o (35), en donde el tumor es cáncer.

(37) La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior (36), en donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer hepático, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer del estómago, cáncer del esófago, o cáncer renal.

(38) Un método para tratar el tumor, caracterizado porque se administra al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con el anterior (1) hasta (18), y (30) hasta (32) a un individuo.

(39) Un método para tratar el tumor, caracterizado

porque se administra al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con el anterior (1) hasta (18), y (30) hasta (32) y al menos un agente terapéutico para el cáncer simultáneamente, separadamente, o secuencialmente a un individuo.

(40) El método de tratamiento de acuerdo con el anterior (38) o (39), en donde el tumor es cáncer.

(41) El método de tratamiento de acuerdo con el anterior (40), en donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer hepático, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer del estómago, cáncer del esófago, o cáncer renal.

Ventaja de la Invención

De acuerdo con la invención, puede obtenerse un agente terapéutico o similar para el cáncer que comprende un anticuerpo que se enlaza a B7-H3 y tiene una actividad antitumor contra células de cáncer.

Breve Descripción de las Figuras

La Fig. 1 es una vista que muestra la presencia o ausencia de actividad ADCP de un anticuerpo anti-B7-H3 contra células NCI-H322. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=3).

La Fig. 2 es una vista que muestra la presencia o ausencia de actividad ADCP de un anticuerpo anti-B7-H3 comercialmente disponible contra células NCI-H322.

La Fig. 3 es una vista que muestra la presencia o ausencia de actividad ADCC de anticuerpo M30 contra células 293 transfectadas con vector vacío y células 293 que expresan B7-H3. Las barras de error en la figura representan errores

estándar (n=3). En la figura, la "imitación" significa la actividad ADCC de M30 contra células 293 transfectadas con vector vacío, y "B7H3" significa la actividad ADCC de M30 contra células 293 que expresan B7-H3.

5 La Fig. 4 es una vista que muestra la presencia o ausencia de actividad CDC de un anticuerpo anti-B7-H3 contra células NCI-H322. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=3).

10 La Fig. 5-1 es una vista que muestra la capacidad de reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgV1). La línea punteada indica la propiedad de enlace de un anticuerpo de control, y la línea sólida indica la propiedad de enlace de un sobrenadante de cultivo de hibridoma M30.

15 La Fig. 5-2 es una vista que muestra la capacidad de reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgC1). La línea punteada indica la propiedad de enlace de un anticuerpo de control, y la línea sólida indica la propiedad de enlace de un sobrenadante de cultivo de hibridoma M30.

20 La Fig. 5-3 es una vista que muestra la capacidad de reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgV2). La línea punteada indica la propiedad de enlace de un anticuerpo de control, y la línea sólida indica la propiedad de enlace de un sobrenadante de cultivo de
25 hibridoma M30.

La Fig. 5-4 es una vista que muestra la capacidad de reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgC2). La línea punteada indica la propiedad de enlace de un anticuerpo de control, y la línea sólida indica

la propiedad de enlace de un sobrenadante de cultivo de hibridoma M30.

La Fig. 5-5 es una vista que muestra la capacidad de reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgC1-V2-C2). La línea punteada indica la propiedad de enlace de un anticuerpo de control, y la línea sólida indica la propiedad de enlace de un sobrenadante de cultivo de hibridoma M30.

La Fig. 5-6 es una vista que muestra la capacidad de reactividad de anticuerpo M30 contra un mutante deficiente en B7-H3 (B7-H3 IgV2-C2). La línea punteada indica la propiedad de enlace de un anticuerpo de control, y la línea sólida indica la propiedad de enlace de un sobrenadante de cultivo de hibridoma M30.

La Fig. 6 es una vista que muestra las actividades antitumor de anticuerpos anti-B7-H3 contra ratones implantados con células NCI-H322. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=10).

La Fig. 7 es una vista que muestra la actividad antitumor del anticuerpo M30 cuando se eliminan los macrófagos *in vivo*. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=8). Además, "mm³" significa "mm³".

La Fig. 8 es una vista que muestra las actividades ADCP del anticuerpo M30 y anticuerpo cM30 contra células NCI-H322. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=4).

La Fig. 9 es una vista que muestra las actividades antitumor del anticuerpo M30 y anticuerpo cM30 contra ratones implantados con células MDA-MB-231. Las barras de error en la

figura representan errores estándar (n=9).

La Fig. 10-1 es una vista que muestra las actividades inhibidoras competitivas del anticuerpo cM30 y anticuerpo M30-H1-L4 contra M30 para el enlace a un antígeno de polipéptido de dominio extracelular de un antígeno de variante 1 B7-H3. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=3).

La Fig. 10-2 es una vista que muestra las actividades inhibidoras competitivas del anticuerpo cM30 y anticuerpo M30-H1-L4 contra M30 para el enlace a un antígeno de polipéptido de dominio extracelular de un antígeno de variante 2 B7-H3. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=3).

La Fig. 11 es una vista que muestra las actividades ADCP del anticuerpo M30, anticuerpo cM30, y anticuerpo M30-H1-L4 contra células NCI-H322. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=4).

La Fig. 12 es una vista que muestra las actividades ADCC of anticuerpo cM30 y anticuerpo M30-H1-L4 contra células NCI-H322. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=3).

La Fig. 13-1 muestra una secuencia de nucleótido de la variante 1 B7-H3 (SEQ ID NO: 5).

La Fig. 13-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la variante 1 B7-H3 (SEQ ID NO: 6).

La Fig. 14-1 muestra una secuencia de nucleótido de variante 2 B7-H3 (SEQ ID NO: 9).

La Fig. 14-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la variante 2 B7-H3 (SEQ ID NO: 10).

La Fig. 15-1 muestra una secuencia de nucleótido de B7-

H3 IgV1 (SEQ ID NO: 20).

La Fig. 15-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la B7-H3 IgV1 (SEQ ID NO: 21).

La Fig. 16-1 muestra una secuencia de nucleótido de B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 22).

5

La Fig. 16-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 23).

La Fig. 17-1 muestra una secuencia de nucleótido de B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 24).

10

La Fig. 17-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 25).

La Fig. 18-1 muestra una secuencia de nucleótido de B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 26).

15

La Fig. 18-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 27).

La Fig. 19-1 muestra una secuencia de nucleótido de B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 28).

La Fig. 19-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 29).

20

La Fig. 20-1 muestra una secuencia de nucleótido de B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 30).

La Fig. 20-2 muestra una secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 31).

25

La Fig. 21-1 muestra una secuencia de nucleótido de un anticuerpo M30 cadena pesada (SEQ ID NO: 50).

La Fig. 21-2 muestra una secuencia de aminoácidos del anticuerpo M30 cadena pesada (SEQ ID NO: 51).

La Fig. 22-1 muestra una secuencia de nucleótido de un anticuerpo M30 cadena ligera (SEQ ID NO: 52).

La Fig. 22-2 muestra una secuencia de aminoácidos del

28

anticuerpo M30 cadena ligera (SEQ ID NO: 53).

La Fig. 23 muestra una secuencia de nucleótido de una señal secretora de cadena κ humana, una región constante de cadena κ humana, y una señal adicional poli-A humana (SEQ ID NO: 56).

5

La Fig. 24 muestra una secuencia de nucleótido de una secuencia de señal y una región constante de IgG1 humano (SEQ ID 57).

La Fig. 25-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena ligera de tipo anticuerpo M30 quimera (SEQ ID NO: 58).

10

La Fig. 25-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo anticuerpo M30 quimera (SEQ ID NO: 59).

La Fig. 26-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena pesada de tipo anticuerpo M30 quimera (SEQ ID NO: 62).

15

La Fig. 26-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo anticuerpo M30 quimera (SEQ ID NO: 63).

La Fig. 27-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena ligera tipo M30-L1 (SEQ ID NO: 70).

La Fig. 27-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L1 (SEQ ID NO: 71).

20

La Fig. 28-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena ligera tipo M30-L2 (SEQ ID NO: 72).

La Fig. 28-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L2 (SEQ ID NO: 73).

25

La Fig. 29-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena ligera tipo M30-L3 (SEQ ID NO: 74).

La Fig. 29-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L3 (SEQ ID NO: 75).

La Fig. 30-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena ligera tipo M30-L4 (SEQ ID NO: 76).

La Fig. 30-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L4 (SEQ ID NO: 77).

La Fig. 31-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena ligera tipo M30-L5 (SEQ ID NO: 78).

5 La Fig. 31-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L5 (SEQ ID NO: 79).

La Fig. 32-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena ligera tipo M30-L6 (SEQ ID NO: 80).

10 La Fig. 32-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L6 (SEQ ID NO: 81).

La Fig. 33-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena ligera tipo M30-L7 (SEQ ID NO: 82).

La Fig. 33-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L7 (SEQ ID NO: 83).

15 La Fig. 34-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena pesada tipo M30-H1 (SEQ ID NO: 84).

La Fig. 34-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo M30-H1 (SEQ ID NO: 85).

20 La Fig. 35-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena pesada tipo M30-H2 (SEQ ID NO: 86).

La Fig. 35-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo M30-H2 (SEQ ID NO: 87).

La Fig. 36-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena pesada tipo M30-H3 (SEQ ID NO: 88).

25 La Fig. 36-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo M30-H3 (SEQ ID NO: 89).

La Fig. 37-1 muestra una secuencia de nucleótido de una cadena pesada tipo M30-H4 (SEQ ID NO: 90).

La Fig. 37-2 muestra una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo M30-H4 (SEQ ID NO: 91).

La Fig. 38 es una vista que muestra la actividad antitumor de un anticuerpo M30 humanizado (M30-H1-L4) contra ratones implantados con células MDA-MB-231. Las barras de error en la figura representan errores estándar (n=6).

Descripción Detallada de la Invención

5

Los términos "cáncer" y "tumor" como se usan en la presente, se usan con el mismo significado.

El término "gen" como se usa en la presente incluye no sólo ADN, sino también mRNA del mismo, cADN del mismo y cARN del mismo.

10

El término "polinucleótido" como se usa en la presente se usa con el mismo significado como un ácido nucleico y también incluye ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos, y cebadores.

15

Los términos "polipéptido" y "proteína" como se usa en la presente se usan sin distinción.

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

20

El término "B7-H3" como se usa en la presente se usa en el mismo significado como proteína B7-H3, y también se refiere a variante 1 B7-H3 y/o variante 2 B7-H3.

25

El término "lesión celular" como se usa en la presente se refiere a un estado en el cual se causa un cambio patológico a las células de alguna forma, y la lesión celular no se limita a lesión directa e incluye todos los tipos de daño a la estructura y función de las células tal como escisión de ADN, formación de dímero base, escisión cromosomal, daño a maquinaria de división celular, y una reducción en varias actividades enzimáticas.

El término "actividad citotóxica" como se usa en la

presente se refiere a la actividad de causar la lesión celular antes descrita.

El término "actividad de fagocitosis mediada por célula dependiente del anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a "actividad de fagocitosis dependiente del anticuerpo (ADCP)" y significa la actividad de células objetivo fagocitosantes tal como células de tumor por monocitos o macrófagos mediados por un anticuerpo. El término también se llama "actividad de fagocitosis dependiente del anticuerpo".

El término "actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a "actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC)" y significa la actividad de daño de células objetivo tal como células de tumor por células NK mediado por un anticuerpo.

El término "actividad citotóxica dependiente del complemento" como se usa en la presente se refiere a "actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" y significa la actividad de daño de células objetivo tal como células de tumor por el complemento mediado por un anticuerpo.

El término "fragmento funcional de un anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a un fragmento parcial de un anticuerpo que tiene una actividad enlazada al antígeno, en donde el fragmento tiene una función completa o parcial del anticuerpo, incluyendo Fab, F(ab')₂, scFv, y similares. El término también incluye Fab' que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo que se obtiene al tratar F(ab')₂ bajo condiciones de reducción. Sin embargo, el

término no se limita a estas moléculas siempre y cuando el fragmento tenga una afinidad de enlace para un antígeno. Además, estos fragmentos funcionales incluyen no sólo un fragmento que se obtiene al tratar una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima apropiada, sino también una proteína producida en una célula hospedera apropiada usando un gen de anticuerpo genéticamente modificado.

El término "Fab'" como se usa en la presente se refiere a un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo que se obtiene al tratar $F(ab')_2$ bajo condiciones de reducción como se describe anteriormente. Sin embargo, Fab' que se produce usando un gen de anticuerpo genéticamente modificado también se incluye en el Fab' de la invención.

El término "epítopo" como se usa en la presente se refiere a un péptido parcial o una estructura terciaria parcial de B7-H3 a la cual un anticuerpo anti-B7-H3 específico se enlaza. El epítopo que es un péptido parcial del B7-H3 antes descrito puede determinarse por un método bien conocido para aquellos expertos en el campo tal como un inmunoensayo, y por ejemplo, puede emplearse el siguiente método. Primero, se producen varias estructuras parciales de un antígeno. En la producción de las estructuras parciales, puede usarse una técnica de síntesis de oligopéptido conocida. Por ejemplo, una serie de polipéptidos que tienen longitudes apropiadamente reducidas que se obtienen al acortar secuencialmente B7-H7 de la C-terminal o N-terminal se producen usando una técnica de recombinación genética conocida por aquellos expertos en el campo. Posteriormente, la capacidad de reactividad de un anticuerpo contra estos

polipéptidos se examina y un sitio de reconocimiento se determina aproximadamente. Luego, los péptidos que tienen longitudes más cortas se sintetizan y la capacidad de reactividad del anticuerpo con estos péptidos se examina, por ello puede determinarse el epítipo. Además, el epítipo que es una estructura terciaria parcial de un antígeno a la cual un anticuerpo específico se enlaza puede determinarse al especificar los residuos de aminoácido del antígeno que se sitúa adyacente al anticuerpo por análisis estructural con rayos X.

La frase "anticuerpos que enlazan al mismo epítipo" como se usa en la presente se refiere a diferentes anticuerpos que se enlazan a un epítipo común. Si un segundo anticuerpo se enlaza a un péptido parcial o una estructura terciaria parcial a la cual un primer anticuerpo se enlaza, puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo enlazan al mismo epítipo. Además, al confirmar que un segundo anticuerpo compite con un primer anticuerpo para el enlace a un antígeno (esto es, el segundo anticuerpo inhibe el enlace entre el primer anticuerpo y el antígeno), puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo enlazan al mismo epítipo aún si la secuencia o estructura del epítipo específica no se ha determinado. Además, cuando el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo enlazan al mismo epítipo y también el primer anticuerpo tiene una actividad especial tal como una actividad antitumor, puede esperarse que el segundo anticuerpo también tenga la misma actividad. En consecuencia, cuando un segundo anticuerpo anti-B7-H3 se enlaza a un péptido parcial al cual un primer anticuerpo anti-B7-H3 se enlaza, puede determinarse

que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo enlazan al mismo epítopo de B7-H3. Además, al confirmar que un segundo anticuerpo anti-B7-H3 compite con un primer anticuerpo anti-B7-H3 para el enlace a B7-H3, puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo son anticuerpos que enlazan al mismo epítopo de B7-H3.

El término "CDR" como se usa en la presente se refiere a una región complementariamente determinante (CDR, por sus siglas en inglés), y se conoce que cada cadena pesada y ligera de una molécula de anticuerpo tiene tres regiones complementariamente determinantes (CDRs). La CDR también se llama la región hipervariable, y se presenta 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, con respecto a las CDRs de un anticuerpo, las CDRs de la cadena pesada son representadas por CDRH1, CDRH2, y CDRH3 del lado de la terminal amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, y las CDRs de la cadena ligera son representadas por CDRL1, CDRL2, y CDRL3 del lado de la terminal amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios son próximos uno al otro en la estructura terciaria y determinan la especificidad para un antígeno a la cual el anticuerpo se enlaza.

La frase "la hibridización se realiza bajo condiciones severas" como se usa en la presente se refiere a un proceso en el cual la hibridización se realiza bajo condiciones bajo las cuales puede alcanzarse la identificación al realizar la hibridización a 68°C en una solución de hibridización

comercialmente disponible, Solución de Hibridización ExpressHyb (fabricada por Clontech, Inc.) o al realizar la hibridización a 68°C en presencia de NaCl 0.7 hasta 1.0 M usando un filtro que tiene ADN inmovilizado en el, seguido por realizar lavado a 68°C usando solución SSC 0.1 hasta 2 x (la solución SSC 1 x está compuesta de NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) o bajo condiciones equivalentes a estas.

1. B7-H3

B7-H3 es un miembro de la familia B7 expresado en células que presentan antígeno como una molécula coestimuladora, y se considera que actúa en un receptor en células T para aumentar o suprimir la actividad inmunitaria.

B7-H3 es una proteína que tiene una estructura de transmembrana de paso sencillo, y el dominio extracelular de N-terminal de B7-H3 contiene dos variantes. La variante 1 B7-H3 (4Ig-B7-H3) contiene un dominio Ig tipo V o tipo C en dos sitios, respectivamente, y la variante 2 B7-H3 (2Ig-B7-H3) contiene un dominio Ig tipo V o tipo C en un sitio, respectivamente.

Como para B7-H3 a usarse en la invención, B7-H3 puede purificarse directamente a partir de células que expresan B7-H3 de un humano o un mamífero no humano (tal como una rata o un ratón) y usarse, o una fracción de membrana celular de las células antes descritas puede prepararse y usarse. Además, B7-H3 puede obtenerse por síntesis *in vitro* del mismo o producción del mismo en una célula hospedera a través de ingeniería genética. En tal ingeniería genética, específicamente, después de que B7-H3 cADN se integra en un vector capaz de expresar B7-H3 cADN, B7-H3 puede obtenerse al sintetizarlo en una solución que contiene enzimas, sustratos

y sustancias de energía requeridas para transcripción y traducción, o al expresar B7-H3 en otra célula hospedera transformada procariótica o eucariota.

La secuencia de nucleótido de una estructura de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés) de un gen variante 1 B7-H3 humano es representada por SEQ ID NO: 5 en el Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos del mismo es representada por SEQ ID NO: 6 en el Listado de Secuencias. Además, las secuencias de SEQ ID NOS: 5 y 6 se muestran en la Fig. 13.

La secuencia de nucleótido de una ORF de un gen variante 2 B7-H3 humano es representada por SEQ ID NO: 9 en el Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos del mismo es representada por SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias. Además, las secuencias de SEQ ID NOS: 9 y 10 se muestran en la Fig. 14.

Además, la proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan y/o agregan en cualquiera de las secuencias de aminoácidos antes descritas de B7-H3 y también tiene una actividad biológica equivalente a la de la proteína también se incluye en B7-H3.

La variante 1 B7-H3 humana madura de la cual la secuencia de señal se ha removido corresponde a una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 27 hasta 534 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6. Además, la variante 2 B7-H3 humana madura de la cual la secuencia de señal se ha removido corresponde a una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 27 hasta 316 de la secuencia de aminoácidos

representada por SEQ ID NO: 6.

En la variante 1 B7-H3, los dominios respectivos se presentan en el orden de IgV1, IgC1, IgV2, e IgC2 a partir de la N-terminal, y en la SEQ ID NO: 6 en el Listado de Secuencias, IgV1 corresponde a los aminoácidos números 27 hasta 139, IgC1 corresponde a los aminoácidos números 140 hasta 244, IgV2 corresponde a los aminoácidos números 245 hasta 357, e IgC2 corresponde a los aminoácidos números 358 hasta 456. Además, en la variante 2 B7-H3, los dominios respectivos se presentan en el orden de IgV1 e IgC2 a partir de la N-terminal, y en la SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias, IgV1 corresponde a los aminoácidos números 27 hasta 140 e IgC2 corresponde a los aminoácidos números 141 hasta 243.

El B7-H3 cADN puede obtenerse por, por ejemplo, el llamado método PCR en el cual una reacción de cadena de polimerasa (de aquí en adelante referida como "PCR") se realiza usando una colección de cADN que expresa B7-H3 cADN como una plantilla y cebadores que amplifican específicamente B7-H3 cADN (Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, 487-49). De manera incidental, un polinucleótido que hibridiza a un polinucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 5 o 9 en el Listado de Secuencias bajo condiciones severas y codifica una proteína que tiene a actividad biológica equivalente a la de B7-H3 también se incluye en B7-H3 cADN. Además, un polinucleótido que es una variante de empalme transcrita del lugar B7-H3 humano o de ratón o un polinucleótido que hibridiza a esta bajo condiciones severas y codifica una proteína que tiene una actividad biológica

equivalente a la de B7-H3 también se incluye en B7-H3 cADN.

Además, la proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos están sustituidos, eliminados o agregados en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6 o 10 en el Listado de Secuencias o una secuencia de aminoácidos que se obtiene al remover la secuencia de señal de cualquiera de estas secuencias y tiene una actividad biológica equivalente a la de B7-H3 también se incluye en B7-H3. Además, la proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de empalme transcrita del lugar B7-H3 humano o de ratón o una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos están sustituidos, eliminados o agregados en la secuencia de aminoácidos anterior y tiene una actividad biológica equivalente a la de B7-H3 también se incluye en B7-H3.

2. Producción de anticuerpo anti-B7-H3

El anticuerpo contra B7-H3 de la invención puede obtenerse al inmunizar un animal con B7-H3 o un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de B7-H3, y coleccionar y purificar el anticuerpo producido *in vivo* de acuerdo con procedimientos comunes. La especie biológica de B7-H3 a usarse como un antígeno no se limita a ser humano, y un animal puede inmunizarse con B7-H3 derivado de un animal diferente a los humanos tal como un ratón o una rata. En este caso, al examinar la reactividad cruzada entre un anticuerpo enlazado al B7-H3 heterólogo que se obtiene y B7-H3 humano, puede seleccionarse un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Además, el anticuerpo monoclonal puede ser el que se

obtiene a partir de un hibridoma establecido al fusionar células que producen anticuerpo que producen un anticuerpo contra B7-H3 con células de mieloma de acuerdo con métodos conocidos (por ejemplo, Kohler and Milstein, Nature, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

De manera incidental, el B7-H3 a usarse como un antígeno puede obtenerse al expresar el gen B7-H3 en una célula hospedera usando ingeniería genética.

Específicamente, se produce un vector capaz de expresar el gen B7-H3, y el vector resultante se transfiere en una célula hospedera para expresar el gen, y luego, el B7-H3 expresado se purifica. De aquí en adelante, se describirá específicamente un método para obtener un anticuerpo contra B7-H3.

(1) Preparación del antígeno

Los ejemplos del antígeno a usarse para producir el anticuerpo anti-B7-H3 incluyen B7-H3, un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos parcial que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de B7-H3, y un derivado que se obtiene al agregar una secuencia de aminoácidos o portador dado a este.

B7-H3 puede purificarse directamente de tejidos de tumor humanos o células de tumor y usarse. Además, B7-H3 puede obtenerse al sintetizarlo en vitro o al producirlo en una célula hospedera por ingeniería genética.

Con respecto a tal ingeniería genética, específicamente, después de que B7-H3 cADN se integra en un vector capaz de expresar B7-H3 cADN, puede obtenerse B7-H3 al sintetizarlo en una solución que contiene enzimas, sustratos

y sustancias de energía requeridas para transcripción y traducción, o al expresar B7-H3 en otra célula hospedera transformada procariótica o eucariota.

Además, el antígeno también puede obtenerse como una proteína secretora al expresar una proteína de fusión que se
5 obtiene al ligar el dominio extracelular de B7-H3, que es una proteína de membrana, a la región constante de un anticuerpo en un sistema hospedero-vector apropiado.

B7-H3 cADN puede obtenerse por, por ejemplo, el llamado
10 método PCR en el cual una reacción de cadena de polimerasa (de aquí en adelante referida como "PCR") se realiza usando una colección de cADN que expresa B7-H3 cADN como una plantilla y cebadores que amplifican específicamente B7-H3 cADN (ver Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pp. 487-
15 489).

Como el sistema para síntesis *in vitro* del polipéptido, por ejemplo, el sistema de Traducción Rápida (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc. puede ejemplificarse, pero no se limita a esto.

Los ejemplos de células hospederas procarióticas
20 incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Con objeto de transformar las células hospederas con un gen objetivo, las células hospederas se transforman por un vector plásmido que comprende un replicón, es decir, un origen de replicación derivado de una especie compatible con el hospedero, y una
25 secuencia reguladora. Además, el vector tiene preferiblemente una secuencia capaz de imponer selectividad fenotípica en la célula transformada.

Los ejemplos de células hospederas eucariotas incluyen células de vertebrados, células de insecto, y células de

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

El transformante que se obtiene de esta manera puede cultivarse de acuerdo con procedimientos comunes, y al cultivar el transformante, se produce un polipéptido objetivo intracelularmente o extracelularmente.

Un medio apropiado a usarse para cultivar puede ser seleccionado de varios medios de cultivo comúnmente usados dependiendo de las células hospederas empleadas. Si se emplea Escherichia coli, por ejemplo, puede usarse un medio LB suplementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG como sea necesario.

Una proteína recombinante producida intracelularmente o extracelularmente por el transformante a través de tal cultivo puede separarse y purificarse por cualquiera de varios métodos de separación conocidos utilizando las propiedades físicas o químicas de la proteína.

Los ejemplos específicos de los métodos incluyen tratamiento con un precipitante de proteína común, ultrafiltración, varios tipos de cromatografía líquida tal como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio de iones, y cromatografía de afinidad, diálisis, y una combinación de los mismos.

Además, al enlazar una etiqueta de seis residuos de histidina a una proteína recombinante a expresarse, la proteína puede purificarse eficientemente con una columna de afinidad de níquel. Alternativamente, al enlazar la región IgG Fc a una proteína recombinante a expresarse, la proteína
5 puede purificarse eficientemente con una columna de proteína A.

Al combinar los métodos antes descritos, una gran cantidad de un polipéptido objetivo puede producirse
10 fácilmente en alto rendimiento y alta pureza.

(2) Producción de anticuerpo monoclonal anti-B7-H3

Los ejemplos del anticuerpo enlazado específicamente a B7-H3 incluyen el anticuerpo monoclonal enlazado específicamente a B7-H3, y se describe enseguida un método
15 para obtener tal anticuerpo.

La producción del anticuerpo monoclonal requiere generalmente las siguientes etapas operacionales de:

(a) purificar un biopolímero a usarse como un antígeno;

(b) preparar células que producen anticuerpo al inmunizar un animal por inyección del antígeno, colectar la
20 sangre, evaluando su titulación de anticuerpo para determinar cuando extirpar el bazo;

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

(d) fusionando las células que producen anticuerpo con
25 el mieloma;

(e) seleccionar un grupo de hibridomas que producen un anticuerpo deseado;

(f) dividir los hibridomas en clones de célula sencilla (clonación);

(g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal implantado con el hibridoma para producir una gran cantidad del anticuerpo monoclonal;

5 (h) examinar el anticuerpo monoclonal de esta manera producido para actividad biológica y especificidad de enlace, o examinar las propiedades del anticuerpo como un reactivo de anticuerpo etiquetado; y similares.

10 De aquí en adelante, el método de producir el anticuerpo monoclonal se describirá en detalle siguiendo las etapas anteriores, sin embargo, el método no se limita a esto, y, por ejemplo, pueden usarse células que producen anticuerpos diferentes a células de bazo y mieloma.

(a) Purificación del antígeno

15 Como el antígeno, puede usarse B7-H3 preparado por el método como se describe anteriormente o un péptido parcial del mismo.

20 Además, una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresan B7-H3 o las células recombinantes que expresan B7-H3 por sí mismas, y también un péptido parcial de la proteína de la invención sintetizado químicamente por un método conocido por aquellos expertos en el campo también puede usarse como el antígeno.

(b) Preparación de células que producen anticuerpo

25 El antígeno obtenido en la etapa (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, puede usarse cualquier animal usando en un método de producción de hibridoma conocido sin ningún problema. Específicamente, por ejemplo, puede usarse

un ratón, una rata, una cabra, oveja, ganado, un caballo, o similares. Sin embargo, desde el punto de vista de facilidad de disponibilidad de células de mieloma a fusionarse con las células que producen anticuerpo extraídas, se usa preferiblemente un ratón o una rata como el animal a inmunizarse.

Además, la cepa de ratón o rata a usarse no se limita particularmente, y en el caso de un ratón, por ejemplo, pueden usarse 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 similares, y en el caso de una rata, por ejemplo, pueden usarse Wistar, Low, Lewis, Sprague Dawley, ACI, BN, Fischer y similares.

Estos ratones y ratas están comercialmente disponibles de criadores/distribuidores de animales experimentales, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

Entre estos, teniendo en cuenta la compatibilidad de fusionar con células de mieloma descritas enseguida, en el caso de un ratón, la cepa BALB/c, y en el caso de una rata, las cepas Wistar y Low son particularmente preferidas como el animal a inmunizarse.

Además, teniendo en cuenta la homología antigénica entre humanos y ratones, también se prefiere usar un ratón que tiene función biológica reducida para remover autoanticuerpos, esto es, un ratón con una enfermedad autoinmunitaria.

La edad de tal ratón o rata al momento de la inmunización preferiblemente es 5 hasta 12 semanas de edad, más preferiblemente 6 hasta 8 semanas de edad.

Con objeto de inmunizar un animal con B7-H3 o un recombinante del mismo, por ejemplo, puede usarse 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. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) o similares.

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

Esto es, primero, una fracción de proteína de membrana que sirve como el antígeno o células que causan que se exprese el antígeno se administran intradérmicamente o intraperitonealmente a un animal.

Sin embargo, se prefiere la combinación de ambas rutas de administración para incrementar la eficiencia de inmunización, y cuando se realiza la administración intradérmica en la primera mitad y la administración intraperitoneal se realiza en la última mitad o sólo en la dosificación final, la eficiencia de inmunización puede incrementarse particularmente.

El programa de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal a inmunizarse, diferencias individuales o similares. Sin embargo, en general, se prefiere un programa de administración en el cual el número de veces que se administra el antígeno es 3 hasta 6 veces y el intervalo de dosificación es 2 hasta 6 semanas, y es más preferido un programa de administración en el cual el número de veces que se administra el antígeno es 3 hasta 4 veces y el intervalo de dosificación es 2 hasta 4 semanas.

Además, la dosis del antígeno varía dependiendo del tipo de animal, diferencias individuales o similares, sin embargo, la dosis generalmente se ajusta hasta 0.05 hasta 5 mg, preferiblemente alrededor de 0.1 hasta 0.5 mg.

5 Se realiza una inmunización de refuerzo 1 hasta 6 semanas, preferiblemente 2 hasta 4 semanas, más preferiblemente 2 hasta 3 semanas después de la administración del antígeno como se describe anteriormente.

10 La dosis del antígeno al momento de realizar la inmunización de refuerzo varía dependiendo del tipo o tamaño de animal o similares, sin embargo, en el caso de, por ejemplo, un ratón, la dosis generalmente se ajusta hasta 0.05 hasta 5 mg, preferiblemente 0.1 hasta 0.5 mg, más preferiblemente alrededor de 0.1 hasta 0.2 mg.

15 Las células de bazo o linfocitos incluyendo células que producen anticuerpo se remueven asépticamente del animal inmunizado 1 hasta 10 días, preferiblemente 2 hasta 5 días, más preferiblemente 2 hasta 3 días después de la inmunización de refuerzo. En este momento, la titulación de anticuerpo se mide, y si un animal que tiene una titulación de anticuerpo
20 suficientemente incrementada se usa como una fuente de suministro de las células que producen anticuerpo, puede llevarse a cabo el procedimiento subsecuente más eficientemente.

25 Los ejemplos del método para medir la titulación de anticuerpo a usarse aquí incluyen un método RIA y un método ELISA, pero el método no se limita a esto.

Por ejemplo, si se emplea un método ELISA, la medición de la titulación de anticuerpo en la invención puede llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos como se describe

enseguida.

Primero, se adsorbe un antígeno purificado o parcialmente purificado a 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 en esta se cubre con una proteína no relacionada al antígeno tal como albúmina de suero de bovino (de aquí en adelante referida como "BSA" , por sus siglas en inglés). Después de lavar la superficie, la superficie se pone en contacto con una muestra diluida en serie (por ejemplo, suero de ratón) como un anticuerpo primario para permitir que el anticuerpo en la muestra se enlace al antígeno.

Además, como un anticuerpo secundario, un anticuerpo etiquetado con una enzima contra un anticuerpo de ratón se agrega y se permite enlazar al anticuerpo de ratón. Después de lavar, el sustrato para la enzima se agrega y un cambio en la absorbancia que se presenta debido al desarrollo de color inducido por la degradación del sustrato o similares se mide y la titulación de anticuerpo se calcula con base en la medición.

La separación de las células que producen anticuerpo a partir de células de bazo o linfocitos del animal inmunizado puede llevarse a cabo de acuerdo 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 de bazo, puede emplearse un método general en el cual las células que producen anticuerpo se separan al homogenizar el bazo para obtener las células a través de filtración con un tamiz de

acero inoxidable y suspender las células en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM, por sus siglas en inglés).

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

5 Las células de mieloma a usarse para fusión celular no están particularmente limitadas y las células apropiadas pueden seleccionarse de líneas celulares conocidas. Sin embargo, teniendo en cuenta la conveniencia cuando un hibridoma es seleccionado de células fusionadas, se prefiere
10 usar una cepa deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se ha establecido.

Más específicamente, los ejemplos de tal cepa deficiente en HGPRT incluyen X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1),
15 P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, y BU.1 derivadas 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) derivadas de humanos. Estas
20 cepas deficientes en HGPRT están disponibles de, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC) o similares.

Estas cepas celulares se subcultivan en un medio apropiado tal como un medio de 8-azaguanina [un medio que se obtiene al agregar 8-azaguanina a un medio de RPMI 1640
25 suplementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, y suero de becerro fetal (de aquí en adelante referido como "FCS" , por sus siglas en inglés)], Medio Dulbecco Modificado de Iscove (de aquí en adelante referido como "IMDM" , por sus siglas en inglés), o Medio Eagle Modificado de Dulbecco (de aquí en adelante referido como "DMEM"). En este caso, 3 hasta

4 días antes de realizar la fusión celular, las células se subcultivan en un medio normal [por ejemplo, un medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.) que contiene FCS al 10%] para asegurar no menos de 2×10^7 células en el día de fusión celular.

5 (d) Fusión celular

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

15 Como tal método, por ejemplo, un método químico en el cual las células que producen anticuerpo y las células de mieloma se mezclan en una solución que contiene un polímero tal como polietilen glicol a una alta concentración, un método físico usando estimulación eléctrica, o similares
20 puede usarse. Entre estos métodos, un ejemplo específico del método químico es como se describe enseguida.

Esto es, en el caso donde el polietilen glicol se usa en la solución que contiene un polímero a una alta
25 concentración, las células que producen anticuerpo y las células de mieloma se mezclan en una solución de polietilen glicol que tiene un peso molecular de 1500 hasta 6000, más preferiblemente 2000 hasta 4000 a una temperatura desde 30 hasta 40°C, preferiblemente desde 35 hasta 38°C por 1 hasta 10 minutos, preferiblemente 5 hasta 8 minutos.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

El método de seleccionar hibridomas que se obtiene por la fusión celular antes descrita no se limita particularmente. Usualmente, se usa un método de selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550).

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

Esto es, al cultivar células no fusionadas e hibridomas en un medio HAT, sólo los hibridomas resistentes a aminopterina se permiten selectivamente que sobrevivan y proliferen.

(f) División en clon de célula sencilla (clonación)

Como un método de clonación para hibridomas, puede usarse un método conocido tal como un método de metilcelulosa, un método de agarosa suave, o un método de dilución limitado (ver, por ejemplo, Barbara, B. M. and 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 cultivo tridimensional tal como un método de metilcelulosa. Por ejemplo, el grupo de hibridomas producido por fusión celular se suspende en un medio de metilcelulosa tal como Medio D de Selección ClonaCell-HY (fabricado por StemCell Technologies, inc., #03804) y cultivar. Entonces, se colectan las colonias de hibridoma formadas, por ello pueden obtenerse hibridomas monoclonales. Las colonias de hibridoma respectivas

colectadas se cultivan, y un hibridoma que se ha confirmado que tiene una titulación de anticuerpo estable en un sobrenadante de cultivo de hibridoma obtenido se selecciona como una cepa de hibridoma que produce anticuerpo monoclonal B7-H3.

5

Los ejemplos de la cepa de hibridoma de esta manera establecida incluyen hibridoma M30 B7-H3. De manera incidental, en esta descripción, un anticuerpo producido por el hibridoma M30 B7-H3 se refiere como "anticuerpo M30" o simplemente "M30".

10

La cadena pesada del anticuerpo M30 tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 51 en el Listado de Secuencias. Además, la cadena ligera del anticuerpo M30 tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias. De manera incidental, en la cadena pesada secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 51 en el Listado de Secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 1 hasta 19 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 142 hasta 471 es una región constante. Además, en la secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 1 hasta 22 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 23 hasta 130 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 131 hasta 235 es una región

15

20

25

constante.

La cadena pesada secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 51 en el Listado de Secuencias es codificada por una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 50 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 50 en el Listado de Secuencias, la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 1 hasta 57 codifica la secuencia de señal de cadena pesada del anticuerpo, la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 58 hasta 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo, y la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 424 hasta 1413 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias es codificada por una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 52 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 52 en el Listado de Secuencias, la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 1 hasta 66 codifica la secuencia de señal de cadena ligera del anticuerpo, la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 67 hasta 390 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo, y la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 391 hasta 705 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.

(g) Preparación de anticuerpo monoclonal al cultivar hibridoma

Al cultivar el hibridoma de esta manera seleccionado, el anticuerpo monoclonal puede obtenerse eficientemente. Sin embargo, antes de cultivar, se prefiere realizar la selección

de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal objetivo.

En tal selección, puede emplearse un método conocido.

La medición de la titulación de anticuerpo en la invención puede llevarse a cabo, por ejemplo, por un método
5 ELISA explicado en el punto (b) descrito anteriormente.

El hibridoma que se obtiene por el método descrito anteriormente puede almacenarse en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un congelador a -80°C o debajo.

Después de completar la clonación, el medio se cambia
10 desde un medio HT a un medio normal, y el hibridoma se cultiva.

Se realiza cultivo a gran escala por cultivo de rotación usando una botella de cultivo grande o por cultivo en centrifugador. Del sobrenadante que se obtiene por el
15 cultivo a gran escala, el anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente a la proteína de la invención puede obtenerse por purificación usando métodos conocidos por aquellos expertos en el campo tal como filtración en gel.

Además, el hibridoma se inyecta en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa como el hibridoma (por ejemplo, la BALB/c antes descrita) o un ratón Nu/Nu para proliferar el
20 hibridoma, por ello los ascitis que contienen una gran cantidad del anticuerpo monoclonal de la invención pueden obtenerse.

En casos donde el hibridoma se administra a la cavidad abdominal, si un aceite mineral tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristano) se administra 3 hasta 7 días antes de esto, una cantidad más grande de los ascitis puede obtenerse.

Por ejemplo, un inmunosupresor se inyecta previamente

en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa como el hibridoma a células T inactivadas. Veinte días posteriormente, se suspenden 10^6 hasta 10^7 células de clon de hibridoma en un medio libre de suero (0.5 ml), y la suspensión se administra a la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen se expande y rellena con los ascitis, los ascitis se colectan del ratón. Por este método, el anticuerpo monoclonal puede ser el que se obtiene a una concentración que es alrededor de 100 veces o más alta que la de la solución de cultivo.

El anticuerpo monoclonal que se obtiene por el método antes descrito puede purificarse por un método descrito en, por ejemplo, Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

El anticuerpo monoclonal de esta manera obtenido tiene una alta especificidad de antígeno para B7-H3.

(h) Ensayo de anticuerpo monoclonal

El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal de esta manera obtenido pueden determinarse como sigue.

Primero, los ejemplos del método de identificación incluyen un método Ouchterlony, un método ELISA, y un método RIA.

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

Por otro lado, cuando un método ELISA o un método RIA se usa, al hacer reaccionar directamente el sobrenadante de cultivo con una fase sólida que adsorbe el antígeno y usando anticuerpos correspondientes a varios tipos de isotipos y

subclases de inmunoglobulina como anticuerpos secundarios, el isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal puede identificarse.

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

Además, la determinación cuantitativa de la proteína puede realizarse por el método Folin Lowry y un método para cálculo con base en la absorbancia a 280 nm [$1.4 \text{ (OD 280)} = \text{Inmunoglobulina } 1 \text{ mg/ml}$].

Además, aún cuando el anticuerpo monoclonal es separadamente e independientemente obtenido al realizar de nuevo las dos etapas de (a) hasta (h) en (2), es posible obtener un anticuerpo que tiene una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo M30. Como un ejemplo de tal anticuerpo, un anticuerpo que se enlaza al mismo epítipo como el anticuerpo M30 puede ejemplificarse. El M30 reconoce un epítipo en el dominio IgC1 o IgC2, que es un dominio en el dominio extracelular B7-H3, y se enlaza al dominio IgC1 o el dominio IgC2 o ambos. Por lo tanto, como el epítipo para el anticuerpo M30, particularmente, un epítipo presente en el dominio IgC1 o IgC2 de B7-H3 puede ejemplificarse. Si un anticuerpo monoclonal recientemente producido se enlaza a un péptido parcial o una estructura terciaria parcial a la cual el anticuerpo M30 se enlaza, puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se enlaza al mismo epítipo como el anticuerpo M30. Además, al confirmar que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo M30 para el enlace a B7-H3 (esto es, el anticuerpo monoclonal inhibe el enlace entre

el anticuerpo M30 y B7-H3), puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se enlaza al mismo epítipo como el anticuerpo M30 aún si la secuencia o estructura del epítipo específica no se ha determinado. Cuando se confirma que el anticuerpo monoclonal se enlaza al mismo epítipo como el anticuerpo M30, el anticuerpo monoclonal se espera fuertemente que tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo M30.

(3) Otros anticuerpos

El anticuerpo de la invención incluye no sólo el anticuerpo monoclonal antes descrito contra B7-H3 sino también un anticuerpo recombinante que se obtiene por modificación artificial para el propósito de reducir la antigenicidad heteróloga para humanos tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden producirse usando métodos conocidos.

Como tal anticuerpo quimérico, un anticuerpo en el cual la variable de anticuerpo y las regiones constantes son derivados de especies diferentes, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en el cual una región variable de anticuerpo derivado de ratón o rata se conecta a una región constante derivada de humano puede ejemplificarse (ver Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)). Un anticuerpo quimérico derivado de un anticuerpo M30 B7-H3 anti-humano de ratón es un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada de la cual la secuencia de aminoácidos consiste de residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 51 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera de la cual la secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de

aminoácidos 23 hasta 130 de SEQ ID NO: 53, y puede tener una región constante arbitraria derivada de humano. Como un ejemplo de tal anticuerpo quimérico, un anticuerpo que consiste de una cadena pesada de la cual la secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 1 hasta 471 de SEQ ID NO: 63 en el Listado de Secuencias y una cadena ligera de la cual la secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 1 hasta 233 de SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias puede ejemplificarse. De manera incidental, en la secuencia de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 63 en el Listado de Secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 1 hasta 19 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 142 hasta 471 es una región constante. Además, en la secuencia de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 1 hasta 20 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 129 hasta 233 es una región constante.

La secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 63 en el Listado de Secuencias es codificada por una secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 62 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 62 en el Listado de Secuencias, la secuencia de nucleótido que consiste de

nucleótidos 1 hasta 57 codifica la secuencia de señal de cadena pesada del anticuerpo, la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 58 hasta 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo, y la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 424 hasta 1413
5 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias es codificada por una secuencia de nucleótido representada por
10 SEQ ID NO: 58 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 58 en el Listado de Secuencias, la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 1 hasta 60 codifica la secuencia de señal de cadena ligera del anticuerpo, la secuencia de nucleótido que
15 consiste de nucleótidos 61 hasta 384 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo, y la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 385 hasta 699 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.

Como tal anticuerpo humanizado, un anticuerpo que se obtiene al integrar sólo una región complementariamente
20 determinante (CDR) en un anticuerpo derivado de humano (ver Nature (1986) 321, pp. 522-525), y un anticuerpo que se obtiene al injertar una parte de los residuos de aminoácido de la estructura así como la secuencia CDR a un anticuerpo humano por el método de injertado CDR (WO 90/07861) puede
25 ejemplificarse.

Sin embargo, el anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo M30 no se limita a un anticuerpo humanizado específico siempre y cuando el anticuerpo humanizado tenga los 6 tipos de secuencias CDR del anticuerpo M30 y tenga una

actividad antitumor. De manera incidental, la región variable de cadena pesada del anticuerpo M30 tiene CDRH1 (NYVMH) que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92 en el Listado de Secuencias, CDRH2 (YINPYNDDVKYNEKFKG) que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 93 en el Listado de Secuencias, y CDRH3 (WGYYGSPLYFDY) que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 94 en el Listado de Secuencias. Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo M30 tiene CDRL1 (RASSRLIYMH) que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 95 en el Listado de Secuencias, CDRL2 (ATSNLAS) que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 96 en el Listado de Secuencias, y CDRL3 (QQWNSNPPT) que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 97 en el Listado de Secuencias.

Como un ejemplo del anticuerpo humanizado del anticuerpo de ratón M30, una combinación arbitraria de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de cualquiera de (1) una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 85, 87, 89, o 91 en el Listado de Secuencias, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% o más con la secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente, y (3) una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente se eliminan, sustituyen o agregan y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de cualquiera de (4) una secuencia de aminoácidos que

consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 71, 73, 75, 77, 79, 81, o 83 en el Listado de Secuencias, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% o más con la secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente, y (6) una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente se eliminan, sustituyen o agregan puede ejemplificarse.

De manera incidental, el término "varios(as)" como se usa en la presente se refiere a 1 hasta 10, 1 hasta 9, 1 hasta 8, 1 hasta 7, 1 hasta 6, 1 hasta 5, 1 hasta 4, 1 hasta 3, o 1 o 2.

Como la sustitución de aminoácidos en esta descripción, una sustitución de aminoácidos conservadora se prefiere. La sustitución de aminoácidos conservadora se refiere a una sustitución que se presenta dentro de un grupo de aminoácidos relacionado a las cadenas laterales de aminoácidos. Los grupos de aminoácidos preferidos son como sigue: un grupo ácido (ácido aspártico y ácido glutámico); un grupo básico (lisina, arginina, e histidina); un grupo no polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, y triptofan); y una familia polar no cargada (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, y tirosina). Los grupos aminoácidos más preferidos son como sigue: un grupo hidroxil alifático (serina y treonina); un grupo que contiene amida (asparagina y glutamina); un grupo alifático (alanina, valina, leucina, y isoleucina); y un grupo aromático (fenilalanina, triptofan, y tirosina). Tal sustitución de aminoácidos preferiblemente se realiza preferiblemente dentro de un grupo que no afecta las

propiedades de una sustancia que tiene la secuencia de aminoácidos original.

Como una combinación preferida de una cadena pesada y una cadena ligera descrita anteriormente, un anticuerpo que

5 consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de una

10 secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 71; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende

15 una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 73; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende

20 una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 75; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende

25 una región variable de cadena ligera que consiste de una

62

secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 77; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20
5 hasta 141 de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 79; un anticuerpo que
10 consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de una
15 secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 81; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos incluyendo residuos de aminoácidos 20 hasta 141
20 de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 83; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que
25 consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 71; un anticuerpo que consiste de una

cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 73; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 75; y un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 de SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 de SEQ ID NO: 77 puede ejemplificarse.

Como una combinación más preferida, un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y una

CA

cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de
 SEQ ID NO: 75; un anticuerpo que consiste de una cadena
 pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 85 y una cadena ligera que comprende una secuencia de
 aminoácidos de SEQ ID NO: 77; un anticuerpo que consiste de
 5 una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos
 de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que comprende una
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79; un anticuerpo que
 consiste de una cadena pesada que comprende una secuencia de
 aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que
 10 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81; un
 anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende
 una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y una cadena
 ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 83; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que
 15 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y una
 cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de
 SEQ ID NO: 71; un anticuerpo que consiste de una cadena
 pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 91 y una cadena ligera que comprende una secuencia de
 20 aminoácidos de SEQ ID NO: 73; un anticuerpo que consiste de
 una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos
 de SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que comprende una
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; y un anticuerpo
 que consiste de una cadena pesada que comprende una secuencia
 25 de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que
 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 puede
 ejemplificarse.

Al combinar una secuencia que tiene una alta homología
 con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada antes

descrita con una secuencia que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena ligera antes descrita, es posible seleccionar un anticuerpo que tiene una actividad citotóxica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos antes descritos. Tal homología generalmente es una homología de 80% o más, preferiblemente una homología de 90% o más, más preferiblemente una homología de 95% o más, aún preferiblemente una homología de 99% o más. Además, al combinar una secuencia de aminoácidos en donde uno a varios residuos de aminoácidos están sustituidos, eliminados o agregados en la cadena pesada o secuencia de aminoácidos de cadena ligera, también es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos antes descritos.

La homología entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando parámetros predeterminados de algoritmo Blast versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). El algoritmo Blast también puede usarse a través de la Internet al acceder al sitio 1334907992153_0.

De manera incidental, en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 85, 87, 89 o 91 en el Listado de Secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 1 hasta 19 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 20 hasta 141 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste de los

residuos de aminoácidos 142 hasta 471 es una región constante.

Además, en la secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 71, 73, 75, 77, 79, 81 o 83 en el Listado de Secuencias, la secuencia de aminoácidos que
 5 consiste de los residuos de aminoácidos 1 hasta 20 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 hasta 128 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste de los
 10 residuos de aminoácidos 129 hasta 233 es una región constante.

Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada representadas por SEQ ID NO: 85, 87, 89 o 91 en el Listado de Secuencias son codificadas por las secuencias de nucleótidos representadas por SEQ ID NO: 84, 86, 88 o 90,
 15 respectivamente, en el Listado de Secuencias. Además, las secuencias representada por SEQ ID NOS: 84 y 85 se muestran en la Fig. 34, las secuencias representadas por SEQ ID NOS: 86 y 87 se muestran en las Figs. 35-1 a 35-2, las secuencias representadas por SEQ ID NOS: 88 y 89 se muestran en las
 20 Figs. 36-1 a 36-2, y las secuencias representadas por SEQ ID NOS: 90 y 91 se muestran en la Fig. 37-1 a 37-2. En cada una de las secuencias de nucleótidos anteriores, la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 1 hasta 57 codifica la
 25 secuencia de señal de cadena pesada del anticuerpo, la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 58 hasta 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo, y la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 424 hasta 1413 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera representadas por SEQ ID NO: 71, 73, 75, 77, 79, 81 o 83 en el Listado de Secuencias son codificadas por secuencias de nucleótidos representadas por SEQ ID NO: 70, 72, 74, 76, 78, 80 o 82, respectivamente, en el Listado de Secuencias. 5 Además, las secuencias representadas por SEQ ID NOS: 70 y 71 se muestran en las Figs. 27-1 a 27-2, las secuencias representadas por SEQ ID NOS: 72 y 73 se muestran en las Figs. 28-1 a 28-2, las secuencias representadas por SEQ ID NOS: 74 y 75 se muestran en las Figs. 29-1 a 29.2, las 10 secuencias representadas por SEQ ID NOS: 76 y 77 se muestran en las Figs. 30-1 a 30-2, las secuencias representadas por SEQ ID NOS: 78 y 79 se muestran en las Figs. 31-1 a 31-2, las secuencias representadas por SEQ ID NOS: 80 y 81 se muestran en las Figs. 32-1 a 32-2, y las secuencias representadas por 15 SEQ ID NOS: 82 y 83 se muestran en las Figs. 33-1 a 33-2. En cada una de las secuencias de nucleótidos anteriores, la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 1 hasta 60 codifica la secuencia de señal de cadena ligera del anticuerpo, la secuencia de nucleótido que consiste de 20 nucleótidos 61 hasta 384 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo, y la secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos 385 hasta 699 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.

25 La homología entre cualquiera de estas secuencias de nucleótidos y una secuencia de nucleótido de otro anticuerpo también pueden determinarse usando el algoritmo Blast.

Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano que se enlaza al mismo epítipo como el anticuerpo M30. Un anticuerpo anti-B7-H3humano se refiere a

un anticuerpo humano que tiene sólo una secuencia de gen de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano. El anticuerpo anti-B7-H3 humano puede obtenerse por un método que usa un ratón que produce un anticuerpo humano que tiene un fragmento de cromosoma humano que comprende genes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano (ver 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.).

Tal ratón que produce anticuerpo humano puede crearse específicamente como sigue. Un animal genéticamente modificado en el cual se han roto los lugares de gen de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, y en su lugar, se han introducido lugares de gen de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana por medio de un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC, por sus siglas en inglés) o similares se crea al producir un animal con genes inactivados y un animal transgénico y emparejar estos animales.

Además, de acuerdo con una técnica de ADN recombinante, al usar cADNs que codifican cada una de tal cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano, y preferiblemente un vector que comprende tales cADNs, las células eucariotas se transforman, y una célula transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante se cultiva, por ello el anticuerpo también puede obtenerse del sobrenadante de cultivo.

Aquí, como el hospedero, por ejemplo, pueden usarse células eucariotas, preferiblemente células de mamífero tales como células CHO, linfocitos, o células de mieloma.

Además, un método para obtener un anticuerpo humano derivado de exhibición de fago seleccionado de una colección de anticuerpo humano (ver 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., Ophthalmology (2002) 109 (3), pp. 427-431, etc.) también se conoce.

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

Al analizar el gen del fago seleccionado con base en su enlace a un antígeno, puede determinarse una secuencia de ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humano que se enlaza a un antígeno.

Si se determina la secuencia de ADN de scFv que se enlaza a un antígeno, un anticuerpo humano puede obtenerse al preparar un vector de expresión que comprende la secuencia e introducir el vector en un hospedero apropiado para 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).

Si un anticuerpo humano producido recientemente se

enlaza a un péptido parcial o una estructura terciaria parcial a la cual el anticuerpo M30 se enlaza, puede determinarse que el anticuerpo humano se enlaza al mismo epítopo como el anticuerpo M30. Además, al confirmar que el anticuerpo humano compite con el anticuerpo M30 para enlazarse a B7-H3 (esto es, el anticuerpo humano inhibe el enlace entre el anticuerpo M30 y B7-H3), puede determinarse que el anticuerpo humano se enlaza al mismo epítopo como el anticuerpo M30 aún si la secuencia o estructura del epítopo específica no se ha determinado. Cuando se confirma que el anticuerpo humano se enlaza al mismo epítopo como el anticuerpo M30, el anticuerpo humano se espera fuertemente que tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo M30.

Los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos humanos que se obtiene por los métodos antes descritos se evalúan por sus propiedades de enlace al antígeno por un método mostrado en el Ejemplo 3 o similares, y puede seleccionarse un anticuerpo preferido.

Como un ejemplo de otro índice para usar en la comparación de las propiedades de anticuerpos, la estabilidad de anticuerpos puede ejemplificarse. Un calorímetro de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés) es un dispositivo capaz de medir rápidamente y exactamente una temperatura de punto medio de desnaturalización térmica (T_m) a usarse como un índice favorable de la estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Al medir los valores T_m usando un DSC y comparar los valores, puede compararse una diferencia en la estabilidad térmica. Se conoce que la estabilidad al almacenado de 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 puede seleccionarse un anticuerpo preferido al usar estabilidad térmica como un índice. Los ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen las siguientes características: 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 la estabilidad térmica más alta, y por lo tanto, es necesario seleccionar un anticuerpo más apropiado para la administración a humanos al hacer una evaluación comprensiva con base en los índices antes descritos.

Además, también se conoce un método en el cual las secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa de un anticuerpo se conectan usando un ligador apropiado, por ello obteniendo una inmunoglobulina de cadena sencilla (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 tal inmunoglobulina de cadena sencilla, el dímero resultante puede tener una estructura y una actividad similar a aquella de un anticuerpo que es un tetrámero por sí mismo. 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. Tal anticuerpo se llama un anticuerpo de dominio sencillo (sdAb) o un nanocuerpo, y de hecho, tal anticuerpo se observa en camellos y llamas y se ha reportado que tiene una afinidad de enlace al antígeno (Muyldemans S. et. al., *Protein Eng.* (1994) 7 (9), 1129-35, Hamers-Casterman C. et. al., *Nature* (1993) 363 (6428) 446-8).

72

Los anticuerpos antes descritos también pueden construirse como un tipo de fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la invención.

En la invención, una variante modificada del anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo también se incluye. La variante modificada se refiere a una variante que se obtiene al someter el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de la invención a modificación química o biológica. Los ejemplos de tal variante químicamente modificada incluyen variantes químicamente modificadas al ligar una porción química a un esqueleto de aminoácido, variantes químicamente modificadas con una cadena de carbohidrato ligada a N o ligada a O, etc. Los ejemplos de tal variante biológicamente modificada incluyen variantes que se obtienen por la modificación después de la traducción (tal como glicosilación ligada a N o ligada a O, procesamiento de N- o C- terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico, u oxidación de metionina), y variantes en las cuales el residuo de metionina se ha agregado a la N-terminal al expresarse en una célula hospedera procariótica.

Además, un anticuerpo etiquetado de manera que permita la detección o aislamiento del anticuerpo o un antígeno de la invención, por ejemplo, un anticuerpo etiquetado con enzima, un anticuerpo etiquetado fluorescente, y un anticuerpo etiquetado por afinidad también se incluyen en el significado de la variante modificada. Tal variante modificada del anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de la invención es útil para mejorar la estabilidad y retención sanguínea del anticuerpo original o un fragmento funcional del anticuerpo de la invención, al reducir la antigenicidad

del mismo, al detectar o aislar tal anticuerpo o un antígeno, etc.

Además, al regular la modificación de un glicano que se liga al anticuerpo de la invención (glicosilación, defucosilación, etc.), es posible aumentar la actividad
5 citotóxica celular dependiente del anticuerpo. Como la técnica para regular la modificación de un glicano de anticuerpos, la WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, etc. describe técnicas conocidas. Sin embargo, la técnica no se limita a esto. En el anticuerpo y el fragmento funcional del
10 anticuerpo de la invención, un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo en el cual la modificación de un glicano se regula también se incluye.

En casos donde un anticuerpo es producido al aislar primero un gen de anticuerpo y luego introducir el gen en un
15 hospedero apropiado, puede usarse una combinación de un hospedero apropiado y un vector de expresión apropiado. Los ejemplos específicos del gen de anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo y un gen que codifica una secuencia
20 de cadena ligera del mismo descrita en esta descripción. Cuando una célula hospedera se transforma, 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
25 separadamente.

En casos donde se usan células eucariotas como el hospedero, pueden usarse células animales, células de plantas, y microorganismos eucarióticos. Como tales células animales, células de mamífero, por ejemplo, células COS de

simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) de células de ovarios de hámster chino (CHO cells; ATCC: CCL-61) pueden ejemplificarse.

En casos donde se usan células procarióticas, por ejemplo, pueden ejemplificarse Escherichia coli y Bacillus subtilis.

Al introducir un gen de anticuerpo deseado o un fragmento funcional del anticuerpo en estas células a través de la transformación, y cultivar las células de esta manera transformadas *in vitro*, puede obtenerse el anticuerpo. En el método de cultivo antes descrito, el rendimiento puede algunas veces variar dependiente de la secuencia del anticuerpo, y por lo tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que se produce fácilmente como un farmacéutico usando el rendimiento como un índice entre los anticuerpos que tienen una actividad de enlace equivalente. Por lo tanto, en el anticuerpo y el fragmento funcional del anticuerpo de la invención, un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo que se obtiene por un método para producir un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, caracterizado porque incluye una etapa de cultivar la célula hospedera transformada y una etapa de coleccionar un anticuerpo deseado o un fragmento funcional del anticuerpo a partir de un producto cultivado obtenido en la etapa de cultivo también se incluye.

De manera incidental, se conoce que el residuo de lisina en la C-terminalarboxilo de la cadena pesada de un

anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada se elimina (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), y también se conoce que dos residuos de aminoácidos (glicina y lisina) en la C-terminalarboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en la célula de mamífero cultivada se eliminan y un residuo de prolina recientemente localizado en la C-terminalarboxilo se amida (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, tal eliminación y modificación de la secuencia de cadena pesada no afecta la afinidad de enlace al antígeno y la función efectora (la activación del complemento, la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, etc.) del anticuerpo. Por lo tanto, en la invención, un anticuerpo y un fragmento funcional del anticuerpo sometidos a tal modificación también se incluyen, y una variante de eliminación en el cual uno o dos aminoácidos se han eliminado en la C-terminalarboxilo de la cadena pesada, una variante que se obtiene por amidación de la variante de eliminación (por ejemplo, la cadena pesada en la cual el residuo de la C-terminalarboxilo de prolina se ha amidado), y similares puede ejemplificarse. El tipo de variante de eliminación que tiene una eliminación en la C-terminalarboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la invención no se limita a las variantes anteriores siempre y cuando la afinidad de enlace del antígeno y la función efectora se conservan. Las dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la invención pueden ser de un tipo seleccionada del grupo que consiste de una cadena pesada de longitud completa y la variante de eliminación antes descrita, o puede ser de dos tipos en combinación seleccionada de estas. La relación de la

cantidad de cada variante de eliminación puede afectarse por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la invención y las condiciones de cultivo, sin embargo, un caso donde un residuo de aminoácido en la C-terminalarboxilo se ha eliminado en ambas de las dos
5 cadena pesadas contenidas como componentes principales en el anticuerpo de acuerdo con la invención, puede ejemplificarse. No hay limitación en el isotipo del anticuerpo de la invención, y los ejemplos del mismo incluyen IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD, e IgE, y los
10 ejemplos preferidos de los mismos incluyen IgG e IgM, y los ejemplos adicionales más preferidos de los mismos incluyen IgG1 e IgG2.

Además, el anticuerpo de la invención puede ser un
15 fragmento funcional del anticuerpo que tiene un sitio enlazado al antígeno del anticuerpo o un fragmento modificado del mismo. El fragmento del anticuerpo puede ser el que se obtiene al tratar el anticuerpo con una proteasa tal como papaina o pepsina, o al modificar el gen de anticuerpo de acuerdo con una técnica de ingeniería genética y que expresa
20 el gen modificado en células cultivadas apropiadas. Entre estos fragmentos de anticuerpo, un fragmento que tiene todo o parte de las funciones del anticuerpo puede llamarse un fragmento funcional del anticuerpo.

25 Como las funciones del anticuerpo, generalmente la actividad de enlace al antígeno, una actividad de neutralizar la actividad de un antígeno, una actividad de aumentar la actividad de un antígeno, actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) puede

ejemplificarse. La función del anticuerpo y el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la invención es una actividad de enlace a B7-H3, preferiblemente actividad de fagocitosis mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCP), más preferiblemente actividad citotóxica (actividad antitumor) mediada por una actividad ADCP contra células de tumor. Además, el anticuerpo de la invención puede tener actividad ADCC y/o actividad CDC además de actividad ADCP. En particular, se ha reportado que un fármaco que contiene un anticuerpo antitumor actualmente disponible que actúa directamente en las células de tumor para bloquear una señal proliferativa, que actúa directamente en las células de tumor para inducir una señal de muerte celular, suprimir la angiogénesis, inducir actividad ADCC mediada por células NK, e induce actividad CDC mediada por el complemento, por ello se suprime el crecimiento de células de tumor (J Clin Oncol 28: 4390-4399. (2010), Clin Cancer Res; 16 (1); 11-20. (2010)), sin embargo, al menos los inventores actuales no son conscientes de que la actividad ADCP del anticuerpo anti-B7-H3 de acuerdo con la invención de esta solicitud se ha reportado como la actividad de un fármaco que contiene un anticuerpo antitumor actualmente disponible.

Los ejemplos del fragmento del anticuerpo incluyen Fab, F(ab')₂, Fv, Fv de cadena sencilla (scFv) en el cual las moléculas Fv de la cadena pesada y la cadena ligera se conectan por medio de un ligador 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 que se obtiene al tratar F(ab')₂ bajo

condiciones de reducción también se incluye en el fragmento del anticuerpo.

Además, el anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo poliespecífico con especificidad para al menos dos tipos diferentes de antígenos. En general, tal molécula se enlaza a dos tipos de antígenos (esto es, un anticuerpo biespecífico), sin embargo, el "anticuerpo poliespecífico" como se usa en la presente incluye un anticuerpo que tiene especificidad para dos o más (por ejemplo, tres) tipos de antígenos.

El anticuerpo poliespecífico de la invención puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de tal anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico F(ab')₂). El anticuerpo biespecífico puede ser producido al conectar las cadenas pesada y ligera (pares HL) de dos tipos de anticuerpos, o también puede producirse al fusionar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales diferentes para preparar células fusionadas que producen 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 puede obtenerse al conectar la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo por medio de un ligador polipéptido (Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113 (editado por Rosenberg and Moore), Springer Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Nature Biotechnology (2005), 23, pp. 1126-1136). Además, un fragmento BiscFv producido al conectar dos moléculas scFv por medio de un

ligador polipéptido también puede usarse como el anticuerpo biespecífico.

Un método para producir un anticuerpo de cadena sencilla se conoce en este campo técnico (ver, por ejemplo, patentes 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 se conectan por medio de un ligador que no forma un conjugado, preferiblemente por medio de un ligador polipéptido (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 pueden ser derivadas del mismo anticuerpo o diferentes anticuerpos.

Como el ligador polipéptido a usarse para conectar las regiones variables, por ejemplo, se usa un péptido de cadena sencilla dado que consiste de 12 hasta 19 residuos.

Un ADN que codifica un scFv puede ser el que se obtiene al realizar la amplificación a través de PCR usando un ADN como una plantilla que comprende todo o una parte deseada de un ADN seleccionado de un ADN que codifica la cadena pesada o la región variable de cadena pesada del anticuerpo antes descrito y un ADN que codifica la cadena ligera o la región variable de cadena ligera del mismo y también usando un par cebador que define ambos extremos del ADN de plantilla, y además realizar la amplificación al combinar un ADN que codifica una porción del ligador polipéptido y un par cebador que define ambos extremos del polipéptido de manera que conectan dichos ambos extremos del mismo a cada una de la cadena pesada y la cadena ligera.

Además, una vez que el ADN que codifica un scFv se

produce, puede obtenerse un vector de expresión que comprende el mismo y un hospedero transformado por el vector de expresión de acuerdo con procedimientos comunes. Además, al usar el hospedero resultante, puede obtenerse un scFv de acuerdo con procedimientos comunes. Un fragmento de anticuerpo del mismo puede producirse en un hospedero al obtener un gen y expresar el gen de la misma manera como se describe anteriormente.

El anticuerpo de la invención puede ser multimerizado para incrementar su afinidad por un antígeno. El anticuerpo a multimerizarse puede ser un tipo de anticuerpo o anticuerpos plurales que reconocen epítopos plurales del mismo antígeno. Como un método para multimerización del anticuerpo, el enlace del dominio IgG CH3 a dos moléculas scFv, enlace a estreptavidina, introducción de una porción hélice-giro-hélice, y similares puede ejemplificarse.

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo policlonal que es una mezcla de tipos plurales de anticuerpos anti-B7-H3 que tienen secuencias de aminoácidos diferentes. Como un ejemplo del anticuerpo policlonal, una mezcla de tipos plurales de anticuerpos que tienen diferente CDR puede ejemplificarse. Como tal anticuerpo policlonal, anticuerpos que se obtiene al cultivar una mezcla de células que producen diferentes anticuerpos y luego purificar los anticuerpos del cultivo resultante puede usarse (ver WO 2004/061104).

Como el anticuerpo modificado, un anticuerpo enlazado a cualquiera de varios tipos de moléculas tal como polietilen glicol (PEG) también puede usarse.

Además, el anticuerpo de la invención puede estar en la forma de un conjugado formado entre cualquiera de estos

anticuerpos y otro agente medicinal (inmunoconjugado). Los ejemplos de tal anticuerpo incluyen un conjugado en el cual el anticuerpo está conjugado a un material radiactivo o un compuesto que tiene una acción farmacológica (Nature Biotechnology (2005) 23, pp. 1137-1146). Los ejemplos del mismo incluyen indio (^{111}In)-capromab pendetido, tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)-nofetumomab merpentan, indio (^{111}In)-ibritumomab, itrio (^{90}Y)-ibritumomab, y yodo (^{131}I)-tositumomab.

El anticuerpo obtenido puede purificarse para homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo puede realizarse empleando un método de separación y purificación de proteína convencional. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse al seleccionar y combinar apropiadamente la cromatografía de columna, filtración en filtro, ultrafiltración, precipitación de sal, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa, electroforesis enfocada isoelectrica, 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 and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero el método no se limita a esto.

Los ejemplos de tal 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.

Tal cromatografía puede realizarse empleando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

Como la columna a usarse en cromatografía de afinidad, una columna de Proteína A y una columna de Proteína G pueden ejemplificarse. Por ejemplo, como una columna que usa una columna de Proteína A, Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) y similares pueden ejemplificarse.

Además, al usar un portador que tiene un antígeno inmovilizado en este, el anticuerpo también puede purificarse utilizando la propiedad de enlace del anticuerpo al antígeno.

3. Farmacéutico que comprende anticuerpo anti-B7-H3

Los anticuerpos que se obtienen por el método descrito en el punto anterior "2. Producción de anticuerpo anti-B7-H3" exhiben una actividad citotóxica contra células de cáncer, y por lo tanto pueden usarse como un farmacéutico, particularmente un agente terapéutico y/o agente preventivo para el cáncer.

La actividad citotóxica exhibida por un anticuerpo *in vitro* puede determinarse al medir la actividad inhibidora del crecimiento celular.

Por ejemplo, una línea de célula de cáncer que sobreexpresa B7-H3 se cultiva, un anticuerpo se agrega al sistema de cultivo a concentraciones diferentes, y puede medirse cualquier actividad inhibidora contra formación enfocada, formación de colonia, y crecimiento esferoide.

El efecto terapéutico *in vivo* de un anticuerpo en el cáncer usando animales experimentales puede determinarse por, por ejemplo, administrar el anticuerpo a ratones sin pelo agénicos implantados con una línea de célula de tumor que sobreexpresa B7-H3 y medir cualquier cambio en las células de cáncer.

Los ejemplos del tipo de cáncer incluyen cáncer de

pulmón, cáncer renal, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de mama, un melanoma, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer del estómago, y cáncer del esófago, sin embargo, el tipo de
5 cáncer no se limita a estos siempre y cuando la célula de cáncer a tratarse exprese B7-H3.

Una sustancia aceptable a usarse en la preparación de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención preferiblemente es no tóxica a un individuo a quien se va a
10 administrar la composición farmacéutica en términos de la dosis y concentración.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender una sustancia para uso farmacéutico que es capaz de cambiar o mantener el pH, presión osmótica, viscosidad,
15 transparencia, color, isotonicidad, condición aséptica, estabilidad, solubilidad, relación de liberación, relación de absorción, y permeabilidad del mismo. Los ejemplos de tal sustancia para uso farmacéutico incluye, pero no se limitan a, aminoácidos tal como glicina, alanina, glutamina,
20 asparagina, arginina, y lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes tal como ácido acórbico, sulfato de sodio, y sulfito ácido de sodio; soluciones amortiguadoras tales como soluciones amortiguadoras de fosfato, citrato, borato, carbonato ácido de sodio, y soluciones Tris-HCl; rellenos
25 tales como manitol y glicina; agentes quelantes tales como tetraacetato de etilendiamina (EDTA); agentes formadores de complejo tales como cafeína, polivinilpirrolidina, β -ciclodextrina, e hidroxipropil- β -ciclodextrina; expansores tales como glucosa, mannososa, y dextrina; otros carbohidratos

tales como monosacáridos y disacáridos; agentes colorantes; saborizantes; diluyentes; agentes emulsificantes; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidina; conservadores tales como polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sales, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicíclico, timerosal, alcohol fenético, metilparaben, propilparaben, clorhexidina, ácido sórbico, y peróxido de hidrógeno; solventes tales como glicerina, propilen glicol, y polietilen glicol; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; agentes de suspensión; tensoactivos tales como éster de sorbitan, polisorbato incluyendo polisorbato 20 y polisorbato 80, Triton, trometamina, lecitina, y colesterol; agentes que aumentan la estabilidad tales como sacarosa y sorbitol; agentes que aumentan la 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 para uso farmacéutico preferiblemente es desde 0.001 hasta 100 veces, particularmente preferiblemente desde 0.1 hasta 10 veces el peso del anticuerpo anti-B7-H3. Aquellos expertos en el campo pueden determinar apropiadamente una formulación preferida de la composición farmacéutica en una preparación dependiendo de la enfermedad a la cual la composición se aplica, la ruta de administración a aplicar, o similares.

El excipiente o portador en la composición farmacéutica puede estar en la forma de un líquido o un sólido. Un excipiente o portador apropiado puede ser agua inyectable, solución salina fisiológica, un fluido cerebroespinal 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 puede usarse como el portador. La composición farmacéutica puede contener una solución amortiguadora Tris de pH 7.0 hasta 8.5, una solución amortiguadora de acetato de pH 4.0 hasta 5.5, o una solución amortiguadora de citrato de pH 3.0 hasta 6.2. Además, tal solución amortiguadora puede ser suplementada con sorbitol u otro compuesto.

Los ejemplos de la composición farmacéutica de la invención incluyen una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H3 y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H3 y al menos un agente terapéutico para el cáncer. La composición farmacéutica de la invención se prepara en la 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 comprende el anticuerpo anti-B7-H3 y la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H3 y al menos un agente terapéutico para el cáncer también pueden formarse en un producto liofilizado usando un excipiente apropiado tal como sacarosa.

En la composición farmacéutica antes descrita, el agente terapéutico para el cáncer a incorporarse junto con el anticuerpo anti-B7-H3 puede administrarse simultáneamente con, separadamente de, o secuencialmente con el anticuerpo anti-B7-H3, o el agente terapéutico y el anticuerpo anti-B7-H3 puede administrarse en intervalos de dosificación diferentes. Los ejemplos de tales agentes terapéuticos para el cáncer incluyen abraxano, carboplatina, cisplatina,

gemcitabina, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina, y agentes medicinales descritos en la WO 2003/038043, y los ejemplos adicionales de los mismos incluyen análogos de LH-RH (tales como leuprorelina y goserelina), fosfato estramustina, antagonistas de estrógeno (tales como tamoxifen y raloxifeno), e inhibidores de aromatasa (tales como anastrozol, letrozol, y exemestano), sin embargo, el agente no se limita a esto siempre y cuando el agente sea un agente medicinal que tenga una actividad antitumor.

Un individuo a quien se va a administrar la composición farmacéutica no se limita particularmente, sin embargo, se prefieren mamíferos, y son más preferidos los humanos.

La composición farmacéutica de la invención puede prepararse para administración parenteral o para absorción gastrointestinal a través de administración oral. La composición y concentración de la preparación puede determinarse dependiendo del método de administración. Entre más alta sea la afinidad del anticuerpo anti-B7-H3 comprendido en la composición farmacéutica de la invención para B7-H3, esto es, menor es la constante de disociación (valor K_d) del mismo para B7-H3, más del anticuerpo anti-B7-H3 puede exhibir su eficacia al fármaco aún cuando se reduce la dosis para humanos. Por lo tanto, la dosis de la composición farmacéutica de la invención para humanos también puede determinarse con base en su resultado. Como para la dosis, en el caso donde se administra un anticuerpo anti-B7-H3 humano a humanos, el anticuerpo puede ser administrado a una dosis desde alrededor de 0.001 hasta 100 mg/kg una vez o varias veces a intervalos de 1 hasta 180 días. Los ejemplos

de la forma de dosificación de la composición farmacéutica de la invención incluyen inyección que incluyen infusiones, supositorios, agentes transnasales, agentes sublinguales, y absorbentes percutáneos.

5 De aquí en adelante, la invención se describirá más específicamente con referencia a los Ejemplos, sin embargo, la invención no se limita a esto. Notar que las operaciones respectivas con respecto a la manipulación de genes en los siguientes Ejemplos se realizaron de acuerdo con los métodos descritos en "Molecular Cloning" (escrito por Sambrook, J.,
10 Fritsch, E. F. and Maniatis, T., publicada por Cold Spring Harbor Laboratory Press en 1989), o en el caso de usar reactivos o kits comercialmente disponibles, estos se usan de acuerdo con las instrucciones adjuntas a estos a menos que se establezca de otra manera.

15 Ejemplos

De aquí en adelante, la invención se describirá en más detalle en los Ejemplos, sin embargo, la invención no se limita a esto.

20 Se señala que las operaciones respectivas con respecto a la manipulación del gen en los siguientes Ejemplos se realizaron de acuerdo a los métodos descritos en "Molecular Cloning" (escrito por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press in 1989), o en el caso de usar reactivos o kits
25 comercialmente disponibles, se usan de acuerdo a los protocolos unidos a esto a menos que se establezca de otra manera.

Ejemplo 1. Producción de plásmido

1)-1 Producción del vector de expresión B7-H3 humano

1)-1-1 Producción del vector de expresión para variante 1 B7-H3 humana de longitud completa

Se realizó una reacción PCR usando un cADN sintetizado del ARN total de células LNCaP (Colección de Cultivo Tipo Americano (ATCC, por sus siglas en inglés)) como una
5 plantilla y también usando el siguiente conjunto cebador, por ello amplifica un cADN que codifica la variante 1 B7-H3 humana:

Cebador 1:

10 5'-ctatagggagacccaagctggctagcatgctgcgtcggcggggcag-3' (SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias); y

Cebador 2:

5'-

15 aacggggccctctagactcgagcggccgctcaggctatttcttgtccatcatcttctttgctgtcag-3' (SEQ ID NO: 2 en el Listado de Secuencias).

Posteriormente, el producto PCR de esta manera obtenido se purificó usando MagExtractor PCR & Gel de limpieza (TOYOBO, Co., Ltd.). Luego, el producto PCR se digirió con enzimas de restricción (NheI y NotI), seguido por purificación usando MagExtractor PCR & Gel de limpieza
20 (TOYOBO, Co., Ltd.). Un ADN plásmido pcADN3.1(+) se digirió con las mismas enzimas de restricción (NheI y NotI), seguido por purificación usando MagExtractor PCR & Gel de limpieza (TOYOBO, Co., Ltd.).

25 Las soluciones de ADN purificadas resultantes se mezclaron, y además, se agregó a esto Ligation high (TOYOBO, Co., Ltd.), y la mezcla resultante se incubó a 16°C durante 8 horas para efectuar la ligación. La mezcla de reacción resultante se agregó a células competentes E. coli DH5α (Invitrogen Corporation) para efectuar la transformación.

Se realizó PCR directa de colonia en las colonias resultantes usando los cebadores PCR y el cebador inverso BGH, y se seleccionó un clon candidato.

El clon candidato obtenido se cultivó en un medio líquido (LB/Amp), y se extrajo un ADN plásmido usando
5 MagExtractor -Plasmid- (TOYOBO, Co., Ltd.).

Al usar el ADN plásmido obtenido como una plantilla, una secuencia entre el siguiente Cebador 3 y Cebador 4 se determinó por análisis de secuencia y las secuencias se compararon entre el clon obtenido y la secuencia CDS
10 proporcionada:

Cebador 3 (cebador promotor CMV):

5'-cgcaaattgggcggttaggcgtg-3' (SEQ ID NO: 3 en el Listado de Secuencias); y

15 Cebador 4 (cebador inverso BGH):

5'-tagaaggcacagtcgagg-3' (SEQ ID NO: 4 en el Listado de Secuencias).

Después de confirmar la secuencia, el clon obtenido se cultivó en 200 ml de medio LB/Amp, y se extrajo un ADN plásmido usando kit Plasmid Midi V-100 (VioGene, Inc.).
20

El vector de esta manera obtenido se nombró "pcADN3.1-B7-H3". La secuencia de la región ORF del gen de variante 1 B7-H3 clonada en este vector está representada por los números de nucleótido 1 hasta 1602 en la SEQ ID NO: 5 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de
25 la variante 1 B7-H3 está representada por la SEQ ID NO: 6 en el Listado de Secuencias.

1)-1-2 Producción del vector de expresión para variante 2 B7-H3 humana de longitud completa

Se realizó PCR usando un cADN sintetizado del ARN total

20

de células LNCaP como una plantilla y también usando el siguiente conjunto cebador, por ello amplifica un cADN que codifica la variante 2 B7-H3 humana:

Cebador 5

5'-

5

ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcacatgctgcgtcgggcagccctg-
3' (SEQ ID NO: 7 en el Listado de Secuencias)

Cebador 6

5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcggctatttcttgt-3' (SEQ ID NO:
8 en el Listado de Secuencias).

10

Se realizó la purificación de la misma manera como en el Ejemplo 1)-1-1, y el producto PCR después de la purificación se integró en un vector pDONR221 (Invitrogen Corporation) por una reacción Gateway BP, por ello transforma E. coli TOP10 (Invitrogen Corporation).

15

Para los clones obtenidos después de la transformación, el tamaño del inserto se confirmó por la colonia PCR. Para 8 clones en los cuales el tamaño del inserto se confirmó, la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto se confirmó al realizar una reacción de procesamiento por secuencia del lado del vector al lado del inserto para ambos extremos. Se realizó una reacción Gateway LR entre el clon de entrada cuya secuencia se confirmó y un vector de destino Gateway pcADN-DEST40 (Invitrogen Corporation). Para el clon obtenido después de la transformación de E. coli TOP10, el tamaño del inserto se confirmó por la colonia PCR. Para el clon en el cual el tamaño del inserto se confirmó, la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto se analizó para confirmar que el inserto de interés se insertó correctamente. Al menos 1 mg del plásmido de esta

20

25

92

manera obtenido del clon se purificó usando Kit PureLink HiPure Plasmid Megaprep (Invitrogen Corporation).

El vector de esta manera obtenido se nombró "variante 2 pcADN-DEST40-B7-H3". La secuencia de la región ORF del gen de variante 2 B7-H3 clonada en este vector está representada por los números de nucleótido 1 hasta 948 en la SEQ ID NO: 9 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la variante 2 B7-H3 está representada por la SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias.

1)-2 Producción del vector de expresión para proteína parcial B7-H3

Al usar el plásmido de longitud completa B7-H3 relacionado con la variante 1 B7-H3 del Ejemplo 1)-1-1 como una plantilla, cada una de las siguientes regiones se amplificó por PCR. Los números muestran cada región de interés correspondiente a los números de nucleótido de B7-H3 representados por la SEQ ID NO: 5. El cebador se diseñó para contener un codón de paro en el extremo 3' además de la secuencia Gateway att.

Cada una de las siguientes regiones 1), 2), y 3) se preparó al amplificar dos regiones y luego ligar las regiones por PCR para formar un fragmento. Esto es, en cuanto a la región 1), se realizó la amplificación usando los Cebadores 7 y 12, y los Cebadores 15 y 11, y los productos PCR resultantes se amplificaron además usando Cebadores 7 y 11. En cuanto a la región 2), se realizó la amplificación usando Cebadores 8 y 13, y los Cebadores 15 y 11, y los productos PCR resultantes se amplificaron además usando Cebadores 8 y 11. En cuanto a la región 3), se realizó la amplificación usando Cebadores 9 y 14, y los Cebadores 15 y 11, y los

productos PCR resultantes se amplificaron además usando Cebadores 9 y 11. En cuanto a la región 4), se realizó la amplificación usando Cebadores 10 y 11. En cuanto a la región 5), se realizó la amplificación usando Cebadores 8 y 11. En cuanto a la región 6), se realizó la amplificación usando Cebadores 9 y 11.

Regiones de interés

- 1) ORF de variante 1 B7-H3: 79-417 y 1369-1602 (573 bp)
- 2) ORF de variante 1 B7-H3: 418-732 y 1369-1602 (549 bp)
- 3) ORF de variante 1 B7-H3: 733-1071 y 1369-1602 (573 bp)
- 4) ORF de variante 1 B7-H3: 1072-1602 (531 bp)
- 5) ORF de variante 1 B7-H3: 418-1602 (1185 bp)
- 6) ORF de variante 1 B7-H3: 733-1602 (870 bp)

Número de cebador y secuencia de base

Cebador 7

5'-ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcggagccctggaggtccaggtc-3'

(SEQ ID NO: 11 en el Listado de Secuencias)

Cebador 8

5'-ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcgctccctactcgaagcccagcatg-3'

(SEQ ID NO: 12 en el Listado de Secuencias)

Cebador 9

5'-ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcggagccgtggaggtccaggtc-3'

(SEQ ID NO: 13 en el Listado de Secuencias)

Cebador 10

5'-ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcgctccctactcgaagcccagcatg-3'

(SEQ ID NO: 14 en el Listado de Secuencias)

Cebador 11

5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcaggctatttcttgtccatcatc-3'

(SEQ ID NO: 15 en el Listado de Secuencias)

Cebador 12

5'-gggaatgtcataggctgcccggccacctgcaggctgacggcag-3' (SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias)

Cebador 13

5'-gggaatgtcataggctgccctgtggggcttctctggggtgtg-3' (SEQ ID NO: 17 en el Listado de Secuencias)

Cebador 14

5'-gggaatgtcataggctgcccggccacctgcaggctgacggcag-3' (SEQ ID NO: 18 en el Listado de Secuencias)

Cebador 15

5'-gggcagcctatgacattccccccagag-3' (SEQ ID NO: 19 en el Listado de Secuencias)

Se realizó la purificación de la misma manera como en el Ejemplo 1)-1-1, y cada uno de los productos amplificados después de la purificación se integró en un vector pDONR221 por una reacción Gateway BP, por ello transformando E. coli TOP10. Para los clones obtenidos después de la transformación, el tamaño del inserto se confirmó por la colonia PCR.

Para cada uno de los clones en los cuales el tamaño del inserto se confirmó, la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto se confirmó al realizar una reacción de procesamiento por secuencia del lado del vector al lado del inserto para ambos extremos.

Para los clones los cuales se confirmaron para tener el inserto de interés, la secuencia de ADN total del inserto también se confirmó usando los siguientes cebadores. Como un resultado del análisis de secuencia, se confirmó que todas de las secuencias fueron completamente idénticas con la

OK

información de las secuencias de interés.

Una reacción Gateway LR entre cada uno de los clones de entrada cuya secuencia se confirmó y se realizó pFLAG-myc-CMV-19-DEST (Invitrogen Corporation). Para los clones obtenidos después de la transformación de E. coli DH10B
5 (Invitrogen Corporation), el tamaño del inserto se confirmó por la colonia PCR.

Para cada uno de los clones en los cuales el tamaño del inserto se confirmó, la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto se analizó para confirmar que el
10 inserto de interés se insertó correctamente. De aquí en adelante, los vectores de expresión obtenidos al integrar cada una de las regiones de arriba 1) hasta 6) se representaron por "B7-H3 IgV1", "B7-H3 IgC1", "B7-H3 IgV2",
"B7-H3 IgC2", "B7-H3 IgC1-V2-C2", y "B7-H3 IgV2-C2",
15 respectivamente.

Las secuencias de nucleótido de las regiones ORF de los genes B7-H3 IgV1, B7-H3 IgC1, B7-H3 IgV2, B7-H3 IgC2, B7-H3 IgC1-V2-C2, y B7-H3 IgV2-C2, cada uno de los cuales se clonó en este vector, están representadas por SEQ ID NOS: 20, 22,
20 24, 26, 28, y 30, respectivamente, en el Listado de Secuencias. Además, las secuencias de aminoácidos de los B7-H3 IgV1, B7-H3 IgC1, B7-H3 IgV2, B7-H3 IgC2, B7-H3 IgC1-V2-C2, y B7-H3 IgV2-C2 están representadas por SEQ ID NOS: 21,
23, 25, 27, 29, y 31, respectivamente, en el Listado de
25 Secuencias. Además, las secuencias representadas por las SEQ ID NOS: 20 y 21 se muestran en la Fig. 15, las secuencias representadas por las SEQ ID NOS: 22 y 23 se muestran en la Fig. 16, las secuencias representadas por las SEQ ID NOS: 24 y 25 se muestran en la Fig. 17, las secuencias representadas

por las SEQ ID NOS: 26 y 27 se muestran en la Fig. 18, las secuencias representadas por las SEQ ID NOS: 28 y 29 se muestran en la Fig. 19, y las secuencias representada por SEQ ID NOS: 30 y 31 se muestran en la Fig. 20.

5 1)-3 Producción de vectores de expresión para genes de la familia B7

El pCMV6-XL-4-B7RP-1, pCMV6-XL-4-B7-H1, y pCMV6-XL-4-B7-DC (los cuales son vectores de expresión del gen obtenidos al integrar cada uno de B7RP-1, B7-H1, y B7-DC (los cuales son genes de la familia B7) en un vector de expresión pCMV6-XL-4) todos se adquirieron de OriGene, Inc.

Los vectores que expresan cada uno de CD80, CD86, y B7-H4, los cuales son genes de la familia B7, se produjeron como sigue.

15 El pENTR/221-CD80, pENTR/221-CD86, y pENTR/221-B7-H4, los cuales son clones obtenidos al integrar cada uno de CD80, CD86, y B7-H4 en un vector de entrada pENTR/221, se adquirieron de Invitrogen Corporation.

20 Una reacción Gateway LR entre cada uno de los clones de entrada cuya secuencia se confirmó y se realizó pcADN3.1-DEST (Invitrogen Corporation). Para los clones obtenidos después de la transformación de E. coli DH10B, el tamaño del inserto se confirmó por la colonia PCR. Para cada uno de los clones en los cuales el tamaño del inserto se confirmó, la secuencia de ADN en el extremo 3' y el extremo 5' del inserto se analizó para confirmar que el inserto de interés se insertó correctamente.

25 Las secuencias de nucleótido de las regiones ORF de los genes B7RP-1, B7-H1, B7-DC, CD80, CD86, y B7-H4, cada uno de los cuales se clonó en este vector, están representadas por

SEQ ID NOS: 32, 34, 36, 38, 40, y 42, respectivamente, en el Listado de Secuencias. Además, las secuencias de aminoácidos de los B7RP-1, B7-H1, B7-DC, CD80, CD86, y B7-H4 están representadas por SEQ ID NOS: 33, 35, 37, 39, 41, y 43, respectivamente, en el Listado de Secuencias.

Ejemplo 2. Producción de anticuerpo monoclonal y selección de anticuerpo

2)-1 Inmunización

Se usaron ratones BALB/cAnNCr1Cr1j (Charles River Laboratories Japan, Inc.), ratones FcγRII KO (Taconic, Inc., IBL Co., Ltd.), o ratones GANP (Transgenic, Inc.) de 4 hasta 6 semanas de edad. En los días 0, 7, 15, y 24, las células LNCaP, células MCF7 (ATCC) o células AsPC1 (ATCC) separadas con verseno (Invitrogen Corporation) se administraron subcutáneamente a la región dorsal de cada ratón en una dosis de 5×10^6 células/ratón. En el día 31, las mismas células se administraron intravenosamente a cada ratón en una dosis de 5×10^6 células. En el día 34, el bazo se extirpó de cada ratón y usó para la producción de hibridomas.

2)-2 Producción de hibridomas

Las células de bazo y células P3X63Ag8U.1 de mieloma de ratón (ATCC) se sometieron a fusión celular usando PEG 4000 (fabricado por IBL Co., Ltd.), por ello produce los hibridomas.

Como un resultado, 9639 clones de los ratones inmunizados con células LNCaP, 4043 clones de los ratones inmunizados con células MCF7, y 3617 clones de los ratones inmunizados con células AsPC1 se establecieron como hibridomas. Al usar el sobrenadante de cultivo obtenido de cada hibridoma, un hibridoma que produce el anticuerpo se

seleccionó por un ensayo CDC.

2)-3 Selección de anticuerpo por ensayo CDC

En el día 0, las células LNCaP o células MCF7 se diluyeron hasta 5000 células por 80 μ L y la solución resultante se agregó a una placa de 96 pozos en 80 μ L/pozo. Luego, las células se cultivaron durante la noche. El sobrenadante de cultivo de hibridoma se agregó en 20 μ L/pozo a la placa en la cual las células se sembraron, y la placa se dejó reposar a 4°C durante 1 hora. A un complemento de conejo liofilizado y diluido (Cedarlane Laboratories), se agregó 1 mL de agua estéril a cada vial en hielo, y el vial se dejó reposar durante 1 minuto, seguido por mezclado, y luego la mezcla resultante se mezcló con 19 mL de medio BSA/RPMI 1640 al 0.1% (BSA, Sigma Co., Ltd.). Una reacción se permitió proceder a 37°C durante 1 hora.

La placa se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos para regresar a temperatura ambiente. Se agregaron 120 μ L de reactivo CellTiter-Glo (Promega Corporation) a cada pozo, y una reacción se permitió proceder a temperatura ambiente durante 10 minutos. La cantidad de luminiscencia se midió usando un lector de placa (ARVO HTS, PerkinElmer, Inc.). En un pozo que exhibe baja luminiscencia, se determinó que se indujo muerte celular dependiente del complemento. Se seleccionó un hibridoma que produce un sobrenadante de cultivo que induce tal muerte celular dependiente del complemento.

Como un resultado, 24 clones de los clones derivados de inmunización con LNCaP, 36 clones de los clones derivados de inmunización con MCF7, y 3 clones de los clones derivados de inmunización con AsPC1 se obtuvieron como clones positivos

por selección.

Ejemplo 3. Identificación de antígeno

3)-1 Identificación de sustancia inmunoprecipitada

3)-1-1 Inmunoprecipitación

5 Se cultivaron células MCF7 en 5 hasta 10×10^8 células.
Estas células se separaron con una espátula para células y
las células separadas se recolectaron y crioconservaron a -
80°C. A las células crioconservadas, se agregaron 10 ml de
una solución amortiguadora de lisis que contiene NP-40 al 1%
10 (Sigma-Aldrich Co., Ltd.) y un inhibidor de proteasa (F.
Hoffmann-La Roche, Ltd.) y se enfrió hasta 4°C y el
peletizado celular se lisó en hielo con una pipeta de tal
manera que la formación de burbujas se evitó. Después de
lisarse completamente, el peletizado se dejó en hielo durante
30 minutos. La muestra solubilizada se centrifugó a 4°C
15 durante 20 minutos a 10000 hasta 15000 rpm, y el sobrenadante
resultante se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml.

500 µl de perlas de proteína G-Sefarosa 4FF (Amersham
Pharmacia Biotech Co., Ltd.) se lavaron tres veces, y
sometieron a intercambio de solución amortiguadora con una
20 solución amortiguadora de lisis. Se agregaron 500 µl de las
perlas de proteína de G-Sefarosa 4FF al sobrenadante de
muestra solubilizada en hielo, y la mezcla resultante se
sometió a agitación rotatoria durante la noche a 4°C.

25 La muestra se pasó a través de columnas de
cromatografía Poly-Prep (Bio-Rad Laboratories, Inc.), y se
usó una fracción a través de la cual pasa como una muestra
inmunoprecipitación.

Se agregó 3 µg de una solución de anticuerpo a usarse
para inmunoprecipitación a 50 µl de perlas de proteína de G-

Sefarosa 4FF sometida a intercambio de solución amortiguadora con solución amortiguadora salina de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) (un tubo de 1.5 ml), y la mezcla resultante se sometió a agitación rotatoria a 4°C durante 1 hasta 16 horas, por ello el anticuerpo se enlazó a las perlas. A la muestra de inmunoprecipitación, se agregaron las perlas a las cuales el anticuerpo se enlazó, y la mezcla resultante se sometió a agitación rotatoria a 4°C durante 3 horas.

La columna se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml vacío, y se agregó a esto 6.5 ml de una solución amortiguadora de lisis. Este procedimiento se repitió 4 veces.

La salida de la columna se tapó, y el pipeteado se realizó con 500 µl de una solución amortiguadora de lisis, y las perlas se recolectaron en un tubo de 1.5 ml. Este procedimiento se repitió dos veces.

Después de la centrifugación a 4°C durante 1 minuto a 5000 rpm, el sobrenadante se removió cuidadosamente. Luego, 90 µl de una solución amortiguadora de elución (glicina-HCl 10 mM, pH 2.0) se agregó a esto, seguido por colocación en vórtice y centrifugación. La columna de la columna de centrifugado de 1.5 ml se separó, y 10 µl de Tris-HCl 1 M (pH 8.5) se agregó a esto, y la columna se regresó al lugar original. Una fracción de elución se transfirió a esto, y se realizó la centrifugación a 10000 rpm durante 1 minuto, por ello 100 µl de una muestra se obtuvo.

La muestra obtenida se sometió a análisis MS por una técnica de digestión de fase líquida como se muestra en el siguiente 3)-1-2.

3)-1-2 Identificación de antígeno por análisis de

espectrometría de masa

De acuerdo con procedimientos comunes, la fracción obtenida por el método de inmunoprecipitación se sometió a una reacción de digestión a 37°C durante 16 horas al agregar tripsina (tripsina modificada, Promega Corporation) a través
5 de una técnica de digestión de fase líquida. Los péptidos digeridos resultantes se sometieron a una cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés)/espectrómetro de masa tándem (MS/MS) (Thermo Fisher Scientific K.K.). Los datos
10 espectrales de masa obtenidos se analizaron usando software de búsqueda de base de datos (Mascot, Matrix Science K.K.). Como la base de datos, se usó Índice de Proteína Internacional (IPI). Como un resultado, 34 tipos de antígenos se identificaron.

De las características de los antígenos identificados,
15 la recuperación de información bibliográfica se realizó con base en la cual B7-H3 es una proteína de membrana celular, y centrándose el antígeno B7-H3 (CD296) (variante 1 B7-H3), se realizaron los experimentos descritos en el siguiente 3)-2 y
3)-3.

20 3)-2 Preparación de células que expresan el gen de antígeno

Las células NIH-3T3 (ATCC) se sembraron en 5×10^4 células/cm² en un matraz recubierto con colágeno tipo I (fabricado por IWAKI Co., Ltd.) y cultivado durante la noche
25 en medio DMEM (Invitrogen Corporation) que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS) bajo las condiciones de 37°C y CO₂ al 5%.

Al siguiente día, las células NIH-3T3 se transfectaron con cada uno del pcADN3.1-B7-H3 producido en el Ejemplo 1)-1-1, variante 2 pcADN-DEST40-B7-H3 producido en 1)-1-2, y

pcADN-DEST40 que es un vector vacío usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation), y cultivado además durante la noche bajo las condiciones de 37°C y CO₂ al 5%.

Al siguiente día, las células NIH-3T3 transfectadas se trataron con tripsina, y lavaron con DMEM que contiene FBS al 10%, y después de eso se suspendieron en PBS que contiene FBS al 5%. La suspensión celular de esta manera obtenida se usó en un análisis citométrico de flujo.

3)-3 Análisis citométrico de flujo

La especificidad de enlace, para B7-H3, del anticuerpo producido por el hibridoma que inmunoprecipita la variante 1 B7-H3 identificada por MS se confirmó por un método citométrico de flujo. La suspensión celular preparada en el Ejemplo 3)-2 se centrifugó, y el sobrenadante se removi6. Luego, el sobrenadante de cultivo de hibridoma se agregó a las células NIH-3T3 transfectadas con cada vector para suspender las células, y las células se dejaron reposar a 4°C durante 1 hora.

Después las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, la fracción IgG de cabra conjugado por fluoresceína para IgG de rat6n (mol6cula completa) (fabricado por ICN Pharmaceuticals, Inc., #55493) diluida hasta 1000 veces con PBS que contiene FBS al 5% se agregó a esto para suspender las células, y las células se dejaron reposar a 4°C durante 1 hora.

Después las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, las células se volvieron a suspender en PBS que contiene FBS al 5% complementado con 2 µg/ml de 7-aminoactinomicina D (fabricado por Invitrogen Corporation (Molecular Probes)), y se realizó la detección usando un

citómetro de flujo (FC500, Beckman Coulter, Inc.). Los datos se analizaron usando Flowjo (Tree Star, Inc.).

Se excluyeron células muertas D-positivas de 7-aminoactinomicina usando una puerta. Luego, se crearon los histogramas de intensidad de fluorescencia FITC de células viables.

Un hibridoma que produce una muestra que da una intensidad de fluorescencia superior en los histogramas de intensidad de fluorescencia de las células NIH-3T3 que expresan la variante 1 B7-H3 y las células NIH-3T3 que expresan la variante 2 B7-H3 que en el histograma de intensidad de fluorescencia de las células NIH-3T3 transfectadas con el vector vacío que sirve como el control se seleccionó como un hibridoma que produce anticuerpo anti-B7-H3.

Como un resultado, se encontró que los anticuerpos derivados de los hibridomas que producen anticuerpo anti-B7-H3 de 5 clones (L7, L8, L11, M30, y M31) tienen reactividad cruzada con la variante 1 B7-H3 y la variante 2 B7-H3.

3)-4 Confirmación de la propiedad de enlace del anticuerpo monoclonal para la línea celular de cáncer

Se examinó en cuanto a si los anticuerpos monoclonales confirman enlace a la variante 1 B7-H3 y la variante 2 B7-H3 en el Ejemplo 3)-3 enlazado a células de cáncer que sobreexpresan la variante 1 B7-H3 y la variante 2 B7-H3 por un método citométrico de flujo de la misma manera como en el Ejemplo 3)-3.

En lugar de las células NIH-3T3 transfectadas, se usaron una línea celular de cáncer mama humano (MDA-MB-231) (ATCC) y una línea celular de cáncer pulmonar humano (NCI-

H322) (ATCC). Como un resultado, se confirmó que los anticuerpos monoclonales establecidos todos enlazan a estas líneas celulares de cáncer.

3)-5 Determinación de isotipo de anticuerpo monoclonal

Los isotipos de los anticuerpos monoclonales se determinaron usando un kit de isotipificación monoclonal de ratón (fabricado por Serotec Co., Ltd.). Como un resultado, los isotipos de los anticuerpos derivados de los hibridomas que producen el anticuerpo anti-B7-H3 (L7, L8, L11, M30, y M31) todos se determinaron parase IgG2a.

3)-6 Preparación de anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal se purificó de los ascitis de un ratón implantado con un hibridoma o un sobrenadante de cultivo de hibridoma (de aquí en adelante, referido como un "material de partida para la purificación de anticuerpo").

Los ascitis de ratón se prepararon como sigue. Primero, ratones BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA Japón, Inc.) de 7 hasta 8 semanas de edad se trataron con pristano (fabricado por Sigma Co., Ltd.), y después de alrededor de 3 semanas, un hibridoma lavado con solución amortiguadora salina fisiológica se implantó dentro de la cavidad abdominal en 1×10^7 células por ratón. Después de 1 hasta 2 semanas, los ascitis acumulados en la cavidad abdominal se recolectaron y esterilizaron a través de un filtro de $0.22 \mu\text{m}$, y el material resultante se usó como un material de partida para la purificación del anticuerpo.

El sobrenadante de cultivo de hibridoma se preparó usando CELLline (fabricado por BD Biosciences, Inc.). Se realizó el cultivo de acuerdo con el protocolo del fabricante excepto que el Medio E de crecimiento ClonaCell-HY (fabricado

por StemCell Technologies, Inc., #03805) se usó como el medio. El sobrenadante de cultivo recolectado se filtró a través de un filtro 0.45 μm , y el material resultante se usó como un material de partida para la purificación del anticuerpo.

5 El anticuerpo se purificó por una columna de afinidad obtenida por Proteína A Recombinante inmovilizada rPA50 (fabricado por RepliGen Corporation) en Formil-Celulofina (fabricado por Seikagaku Corporation) (de aquí en adelante abreviado como "Proteína A de Formil-Celulofina") o Hitrap
10 MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation). En el caso de la Proteína A de Formil-Celulofina, el material de partida para la purificación del anticuerpo se diluyó hasta 3 veces con una solución amortiguadora de enlace (NaCl 3 M, glicina 1.5 M, pH 8.9), y
15 la solución resultante se agregó a una columna, luego, la columna se lavó con la solución amortiguadora de enlace, seguido por elución con ácido cítrico 0.1 M (pH 4.0). Por otro lado, en el caso del Hitrap MabSelect SuRe (GE
20 Healthcare Corporation), el material de partida para la purificación del anticuerpo se agregó a una columna, y la columna se lavó con PBS, seguido por elución con Arginina-HCl 2 M (pH 4.0).

Después de que la solución de anticuerpo eluida se neutralizó, la solución amortiguadora se intercambió con PBS.

25 La concentración del anticuerpo se obtuvo al eluir el anticuerpo enlazado a POROS G 20 μm Columna PEEK, 4.6 mm $\times$ 100 mm, 1.7 ml (Applied Biosystems, Inc.) y medir la absorbancia (O.D. 280 nm) del eluido. Específicamente, una muestra de anticuerpo diluida con PBS se agregó a POROS G 20

µm equilibrado con una solución amortiguadora de equilibrio (fosfato diácido de sodio 30.6 mM/12 ac., fosfato de monopotasio 19.5 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.0). Luego, la columna se lavó con la solución amortiguadora de equilibrio, y el anticuerpo enlazado a la columna luego se eluyó con un eluyente (HCl al 0.1% (v/v), NaCl 0.15 M). El área del pico de la absorbancia (O.D. 280 nm) del eluido se midió, y la concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de la muestra de anticuerpo (mg/ml)} = \frac{(\text{Área pico de la muestra de anticuerpo})}{(\text{Área pico del estándar de referencia (IgG1 humano)})} \times \text{Concentración de estándar de referencia (mg/ml)} \times \text{factor de dilución de muestra.}$$

Además, la concentración de endotoxina contenida en el anticuerpo obtenido se midió usando Conjunto Endospecy ES-50M (Seikagaku Corporation, #020150) y un Conjunto CSE-L estándar de referencia endotoxina (Seikagaku Corporation, #020055) y se confirmó para ser 1 EU/mg o menos. El anticuerpo resultante se usó en el experimento posterior.

Ejemplo 4. Propiedades del anticuerpo anti-B7-H3

4)-1 Actividad ADCP

Se administraron 1.5 mL de tioglicolato en la cavidad abdominal de un ratón Balb/c-nu/nu (hembra, de 6 hasta 10 semanas de edad) (Charles River Laboratories Japan, Inc.). 5 días después de esto, los macrófagos se recolectaron de la cavidad abdominal. Los macrófagos se agregaron a una placa de 24 pozos en 500 µL/pozo (1×10^5 células/pozo) y cultivaron durante la noche a 37°C. Los macrófagos de esta manera preparados se usaron como células efectoras.

El etiquetado de células NCI-H322 a usarse como células objetivo se realizó usando kit de etiquetado de pigmento PKH26 (Sigma Co., Ltd.). Las células objetivo se separaron con TrypLE (Invitrogen Corporation) y lavaron dos veces con PBS. Las células se suspendieron en Diluyente C en 1×10^7 células/ml. La solución madre del pigmento PKH26 (1 mM) se diluyó hasta 8 μ M con diluyente C, e inmediatamente después de eso, la solución del pigmento diluido se agregó a esto en una cantidad igual a aquella de la suspensión celular. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, 1 ml de suero se agregó a esto, y además, un medio con suero se agregó a esto, y se realizó el lavado dos veces. Las células de esta manera preparadas se usaron como las células objetivo.

El anticuerpo obtenido en el Ejemplo 3)-6 se diluyó hasta 20 μ g/ml con una solución de cultivo. Posteriormente, las células objetivo obtenidas en el Ejemplo 4)-1-1 se suministraron a 2×10^6 células/100 μ l/tubo y mezclaron. La mezcla resultante se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se removi6, y las células se lavaron dos veces con una solución de cultivo y suspendieron en 500 μ l de una solución de cultivo. El sobrenadante se removi6 de las células efectoras, y las células que se han tratado con el anticuerpo y suspendido en la solución de cultivo se agregaron a esto y mezclaron con esto. Luego, las células se cultivaron durante 3 horas en una incubadora de CO₂. Después de eso, las células se separaron con Tripsina-EDTA y se recolectaron. A las células recolectadas, se agregó un anticuerpo CD11b anti-rat6n etiquetado FITC (Becton, Dickinson and Company, Ltd.), y la mezcla resultante se dejó

reposar en hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se removi6, y las c6lulas se lavaron dos veces con una soluci6n de cultivo. Las c6lulas recolectadas se suspendieron en 300 μ l de una soluci6n de cultivo y analizaron por FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company, Ltd.). En los macr6fagos CD11b-positivos, una fracci6n PKH26-positiva se evalu6 como c6lulas de fagocitosis-positivas (n=3).

Como un resultado, como se muestra en la Fig. 1, L7, L8, L11, M30, y M31 inducen la fagocitosis de las c6lulas NCI-H322 por macr6fagos para dar un porcentaje de fagocitosis de $48.0 \pm 0.9\%$, $52.3 \pm 1.1\%$, $57.1 \pm 2.5\%$, $61.9 \pm 2.1\%$, y $57.7 \pm 3.0\%$, respectivamente. En consecuencia, se mostr6 que los anticuerpos L7, L8, L11, M30, y M31 tienen actividad ADCP contra c6lulas NCI-H322.

De la misma manera, se obtuvieron anticuerpos anti-B7-H3 comercialmente disponibles y la actividad ADCP de los mismos se midi6. Se obtuvieron un anticuerpo MIH35 B7-H3 anti-humano de rata (eBioscience Company), un anticuerpo 185504 B7-H3 anti-humano de rat6n (R&D Systems, Inc.), MIH42 (Serotec Co., Ltd.), y DCN70 (Biolegend Company). Se confirm6 que estos anticuerpos enlazan a B7-H3 de la misma manera como en el Ejemplo 3)-3. Al usar estos anticuerpos, la actividad ADCP se midi6 por el m6todo de arriba.

Como un resultado, como se muestra en la Fig. 2, cuando se agrega en 1 μ g/ml, MIH35, MIH42, y DCN70 inducen la fagocitosis de las c6lulas NCI-H322 por macr6fagos para dar un porcentaje de fagocitosis de 4.2%, 8.2%, y 10.8%, respectivamente. En consecuencia, se revel6 que MIH35, MIH42, y DCN70 casi no exhibe la actividad ADCP.

A partir de estos resultados, se mostr6 que los clones

M30 que reconocen B7-H3 obtenidos por selección tienen una actividad ADCP marcadamente superior que los anticuerpos B7-H3 comercialmente disponibles.

4)-2 Actividad ADCC

4)-2-1 Preparación de células efectoras

5 El bazo se extirpó asépticamente de un CAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrlCrlj de ratón sin pelo (Charles River Laboratories Japan, Inc.). El bazo extirpado se homogenizó con dos portaobjetos, y sometió a un tratamiento de hemólisis usando
10 BD Pharm Lyse (fabricado por BD Biosciences, Ltd. #555899). Las células de bazo de esta manera obtenidas se suspendieron en RPMI 1640 libre de rojo de fenol (fabricado por Invitrogen Corporation) que contiene suero de bovino fetal al 10%, IgG Ultra-bajo (fabricado por Invitrogen Corporation) (de aquí en
15 adelante abreviado como "medio ADCC"), y la suspensión celular se pasó a través de un filtro celular (tamaño del poro: 40 μ m, fabricado por BD Biosciences, Ltd.). Luego, las células viables se contaron por un ensayo de exclusión de pigmento azul de tripano. Después la suspensión celular del
20 bazo se centrifugó, el medio se removió, y las células se volvieron a suspender en el medio ADCC a una densidad celular viable de 1.5×10^7 células/ml y usaron como células efectoras.

4)-2-2 Preparación de células objetivo

25 Las células 293 que expresan B7-H3 (ATCC) y las células 293 transfectadas con el vector vacío preparadas de la misma manera como en el Ejemplo 3)-3 se trataron con tripsina, y las células tratadas de cada tipo se lavaron con RPMI 1640 que contiene FBS al 10% (Invitrogen Corporation) y luego se volvieron a suspender en RPMI 1640 que contiene FBS al 10%.

Las células (4×10^6 células) de cada tipo se mezclaron con cromio-51 (5550 kBq) esterilizado a través de un filtro 0.22 μm , y se realizó el etiquetado durante 1 hora bajo las condiciones de 37°C y CO_2 al 5%. Las células etiquetadas se lavaron tres veces con RPMI 1640 que contiene FBS al 10% (Invitrogen Corporation), y las células se volvieron a suspender en 2×10^5 células/ml en el medio ADCC y se usaron como células objetivo.

4)-2-3 Ensayo de liberación ^{51}Cr

Las células objetivo en una densidad celular de 2×10^5 células/ml se suministraron a 50 μl /pozo en una microplaca de fondo en forma de U de 96 pozos. Se agregó a esto 50 μl de M30 o un anticuerpo de control de isotipo (mIgG2a) (eBioscience Company), diluido con el medio ADCC de manera que la concentración final del anticuerpo después de agregar las células efectoras fue 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Luego, la placa se dejó reposar a 4°C durante 1 hora. Después de eso, se agregaron a esto 100 μl de las células efectoras en una densidad celular de 1.5×10^7 células/ml, y las células se cultivaron durante la noche bajo las condiciones de 37°C y CO_2 al 5%. Al siguiente día, el sobrenadante se recolectó en una LumaPlate (fabricado por PerkinElmer, Inc.), y la radiación gamma emitida de ahí se midió usando un contador gamma. El porcentaje de lisis celular provocada por la actividad ADCC se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Porcentaje de lisis celular (\%)} = (A-B) / (C-B) \times 100$$

A: conteo de radiación del pozo de muestra

B: Conteo de emisión de radiación espontanea promedio (de los pozos a los cuales el anticuerpo y las células efectoras no se agregaron) (n=3). Se realizó el mismo

procedimiento como aquel para el pozo de muestra excepto que el medio ADCC se agregó en una cantidad de 50 μ l al momento de agregar el anticuerpo y en una cantidad de 100 μ l al momento de agregar las células efectoras.

5 C: Conteo de emisión de radiación máximo promedio (de los pozos en los cuales las células objetivo se disolvieron con un tensoactivo) (n=3). El mismo procedimiento como aquel para el pozo de muestra se realizó excepto que 50 μ l del medio ADCC se agregó al momento de agregar el anticuerpo y se agregó 100 μ l del medio ADCC que contiene Triton X-100 al 2% (v/v) al momento de agregar las células efectoras.

Los datos mostrados son un promedio de mediciones en triplicado, y las barras de error representan desviaciones estándares. El valor P se calculó usando prueba t de Student. Los resultados de medición se muestran en la Fig. 3.

15 Como un resultado, M30 exhibe actividad de lisis celular con un porcentaje de lisis celular de $31.6 \pm 3.3\%$ contra las células 293 que expresan B7-H3, y por lo tanto, se mostró que el anticuerpo M30 tiene actividad ADCC contra las células 293 que expresan B7-H3.

20 4)-3 Actividad CDC

Un experimento se realizó de la misma manera como en el Ejemplo 2)-3-1. Ya que las células para uso en la evaluación, se usaron células NCI-H322. Cada uno de los anticuerpos anti-B7-H3 (L7, L8, L11, M30, y M31) obtenidos en el Ejemplo 3)-6 y un anticuerpo de control de isotipo (mIgG2a) diluido con RPMI 1640 que contiene FBS al 10% (que contiene antibióticos: penicilina y estreptomicina) se agregó de manera que la concentración final del anticuerpo después de agregar el complemento fue 25 μ g/ml, y la mezcla resultante se dejó

115

reposar a 4°C durante 1 hora. A esto se agregó complemento de
 conejo (fabricado por Cedarlane Laboratories, #CL3051)
 diluido hasta 30% con RPMI 1640 de manera que la
 concentración final del complemento fue 5%, y la mezcla
 resultante se incubó durante 1 hora bajo las condiciones de
 5 37°C y CO₂ al 5%. Luego, la mezcla se dejó reposar a
 temperatura ambiente durante 30 minutos. Con objeto de medir
 la viabilidad celular, el Ensayo de Viabilidad Celular
 Luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega
 Corporation) se agregó a esto en una cantidad igual a aquella
 10 de la solución de cultivo, y la mezcla resultante se agitó a
 temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de eso, la
 cantidad de luminiscencia se midió usando un lector de placa.
 La viabilidad celular se calculó de acuerdo con la siguiente
 ecuación.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = (a-b) / (c-b) \times 100$$

a: Cantidad de luminiscencia del pozo de muestra

b: Cantidad promedio de luminiscencia de respaldo (de
 pozos a los cuales las células y el anticuerpo no se
 agregaron) (n=3). El mismo procedimiento como aquel para el
 20 pozo de muestra se realizó excepto que una cantidad igual de
 RPMI 1640 que contiene FBS al 10% (que contiene antibióticos:
 penicilina y estreptomicina) se agregó en lugar de la
 suspensión celular al momento de sembrar la célula y se
 agregó RPMI 1640 que contiene FBS al 10% (que contiene
 25 antibióticos: penicilina y estreptomicina) en una cantidad
 igual a aquella de la solución de dilución del anticuerpo al
 momento de agregar el anticuerpo.

c: Cantidad promedio de luminiscencia de pozos a los
 cuales el anticuerpo no se agregó (n=3). El mismo

procedimiento como aquel para el pozo de muestra se realizó excepto que RPMI 1640 que contiene FBS al 10% (que contiene antibióticos: penicilina y estreptomicina) se agregó en una cantidad igual a aquella de la solución de dilución del anticuerpo al momento de agregar el anticuerpo.

Los resultados de medición se muestran en la Fig. 4. Los datos mostrados son un promedio de mediciones en triplicado, y las barras de error representan desviaciones estándares. Como un resultado, el anticuerpo de control, L7, L8, L11, M30, y M31 inducen una disminución en viabilidad celular de las células NCI-H322 hasta $101.5 \pm 3.3\%$, $6.3 \pm 4.2\%$, $13.6 \pm 9.1\%$, $7.2 \pm 1.4\%$, $7.5 \pm 1.8\%$, y $12.8 \pm 2.0\%$, respectivamente, en la presencia del complemento. Por lo tanto, se mostró que los anticuerpos L7, L8, L11, M30, y M31 tienen actividad CDC contra las células NCI-H322.

4)-4 Determinación del dominio de enlace

Se examinó en cuanto a qué dominio de B7-H3 M30 se enlaza por un método citométrico de flujo de la misma manera como en el Ejemplo 3)-3. Se usaron células NIH-3T3 transfectadas con cada uno de los vectores de expresión para proteínas parciales B7-H3 preparadas en el Ejemplo 1)-1-3.

Como un resultado, como se muestra en las Figs. 5-1 a 5-6, se confirmó que M30 enlaza a B7-H3 IgC1, B7-H3 IgC2, B7-H3 IgC1-V2-C2, y B7-H3 IgV2-C2. M30 no enlaza a B7-H3 IgV1 y B7-H3 IgV2.

De estos resultados, se mostró que M30 enlaza al dominio C1 (la secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 140 hasta 244 en la SEQ ID NO: 6) y el dominio C2 (la secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 358 hasta 456 en la SEQ ID NO: 6) de

B7-H3. De la misma manera, también se mostró que L8, L11, y M31 enlaza al dominio C1 y el dominio C2, y L7 enlaza al dominio V1 (la secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 27 hasta 139 en la SEQ ID NO: 6) y el dominio V2 (la secuencia de aminoácidos representada por
 5 números de aminoácido 245 hasta 357 en la SEQ ID NO: 6).

En consecuencia, se mostró que M30 reconoce un epítipo en el dominio IgC1 y/o el dominio IgC2, cada uno de los cuales es un dominio en el dominio extracelular B7-H3, y enlaza al dominio IgC1 o el dominio IgC2 o ambos.

10 4)-5 Especificidad de antígeno

La especificidad de antígeno de M30 se examinó por un método citométrico de flujo de la misma manera como en el Ejemplo 3)-3.

15 Se usaron células 293T transfectadas con cada uno de los vectores de expresión para las proteínas CD80, CD86, B7-RP-1, B7-H1, B7-DC, y B7-H4, que son proteínas de la familia B7, preparados en el Ejemplo 1)-1-4.

20 Como un resultado, se mostró que M30 no enlaza a CD80, CD86, B7-RP-1, B7-H1, B7-DC, y B7-H4, que son moléculas de la familia B7.

Ejemplo 5. Efecto antitumor *in vivo*

5)-1 Efecto antitumor *in vivo* del anticuerpo anti-B7-H3

25 Las células NCI-H322 se separaron de un matraz de cultivo por un tratamiento de tripsina, y luego se suspendieron en RPMI 1640 que contiene FBS al 10% (Invitrogen Corporation), seguido por centrifugación, y el sobrenadante se removió. Las células se lavaron dos veces con el mismo medio, y luego se suspendieron en solución salina fisiológica (fabricado por Otsukun Pharmaceutical Co., Ltd.). Luego, las

11A

células se implantaron subcutáneamente en la región axiliar de cada uno de un grupo de ratones BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA Japan, Inc.) con 6 semanas de edad en una dosis de 1×10^7 células/ratón. El día del implante se tomó como el día 0, y en los días 10, 17, 24, 31, y 38, cada uno de los anticuerpos L7, L8, L11, M30, y M31 se administró intraperitonealmente en una dosis de 500 µg/ratón (alrededor de 25 mg/kg). Para el control, PBS se administró intraperitonealmente en un volumen (500 µl) igual a aquella del anticuerpo. El volumen del tumor se midió en los días 10, 17, 24, 31, 38, y 45, y se examinó el efecto antitumor de la administración del anticuerpo.

Como un resultado, en los grupos de administración M30 y M31, el crecimiento del tumor se suprimió significativamente como se compara con el grupo de administración PBS. (Los valores P para M30 y M31 comparado con el grupo de administración PBS en términos del volumen del tumor en el día 45 fueron $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente. Los valores P se calcularon usando prueba t de Student.). Además, la relación de la inhibición del crecimiento del tumor ($= 100 - (\text{volumen del tumor promedio en el grupo de administración del anticuerpo}) / (\text{volumen del tumor promedio en el grupo de administración PBS}) \times 100$) en el día 45 en el caso de L7, L8, L11, M30, y M31 fue -16.1%, 0.2%, 25.5%, 47.2%, y 58.2%, respectivamente. En consecuencia, los anticuerpos M30 y M31 se observaron para tener un efecto antitumor muy fuerte *in vivo* (Fig. 6).

De los resultados de arriba, se reveló que los anticuerpos M30 y M31 son anticuerpos que reconocen un antígeno B7-H3 y exhiben un efecto antitumor.

5)-2 Efecto antitumor *in vivo* bajo condiciones de eliminación

115

de macrófagos

Con objeto de eliminar macrófagos *in vivo*, se produjeron liposomas encapsulados por clodronato. Se ha reportado que al administrar liposomas encapsulados por clodronato *in vivo*, los macrófagos *in vivo* se eliminan (Journal of immunological methods 1994, vol. 174, pp. 83-93). De acuerdo con el método en este reporte, los liposomas encapsulados por clodronato se produjeron y usaron en el siguiente experimento.

Las células NCI-H322 se separaron de un matraz de cultivo por un tratamiento de tripsina, y luego se suspendieron en RPMI 1640 que contiene FBS al 10% (Invitrogen Corporation), seguido por centrifugación y el sobrenadante se removió. Las células se lavaron dos veces con el mismo medio, y luego se suspendieron en solución salina fisiológica (PBS, fabricado por Otsukun Pharmaceutical Co., Ltd.). Luego, las células se implantaron subcutáneamente en la región axiliar de cada ratón BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA Japan, Inc.) con 6 semanas de edad en una dosis de 1×10^7 células/ratón. El día del implante se tomó como el día -14, y el agrupamiento se realizó en el día 0.

En un grupo en el cual los macrófagos *in vivo* en los ratones fueron para eliminarse, los liposomas encapsulados por clodronato se inyectaron intravenosamente en una dosis de 0.2 mL/ratón en los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, y 32. Además, en el grupo de control negativo, PBS se inyectó intravenosamente en una dosis de 0.2 mL/ratón en los mismos días (en los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, y 32).

Posteriormente, el anticuerpo M30 se administró intraperitonealmente a ambos grupos en una dosis de 500

µg/ratón (alrededor de 25 mg/kg) en los días 1, 8, 15, 22, y 29. Además, como el control negativo, PBS se administró intraperitonealmente a ambos grupos en un volumen (500 µl) igual a aquella del anticuerpo M30 en los mismos días (en los días 1, 8, 15, 22, y 29).

5

El volumen del tumor se midió en los días 0, 8, 15, 22, 29, y 36, y el efecto antitumor de la administración del anticuerpo se examinó (n=8).

Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2, y Fig.

7.

10

Tabla 1

15

20

25

Volumen del tumor	En el día 0		En el día 8		En el día 15	
	Promedio (mm³)	Desviación estándar	Promedio (mm³)	Desviación estándar	Promedio (mm³)	Desviación estándar
PBS + grupo de administración PBS	104.375	6.491581086	149	10.60828517	227.5	18.20027472
Clod lip + grupo de administración PBS	114.625	4.862162585	159.375	7.676349346	318.625	26.37567704
PBS + grupo de administración M30	103.5	7.221001118	123.625	14.89958952	145	19.58497967
Clod lip + grupo de administración M30	104.625	5.47049717	143.375	10.46753058	247.75	24.44947414

Volumen del tumor	En el día 22		En el día 29		En el día 36	
	Promedio (mm³)	Desviación estándar	Promedio (mm³)	Desviación estándar	Promedio (mm³)	Desviación estándar
PBS + grupo de	394.75	25.77772433	601.25	43.17065389	827	50.82638516

117

administración PBS						
Clod lip + grupo de administración PBS	443.625	23.52653327	619.75	40.9550058	1002.75	78.18493415
PBS + grupo de administración M30	186.25	25.920035	301.75	47.13610612	415.25	79.84175197
Clod lip + grupo de administración M30	384.25	40.10644319	641.375	80.12176838	837.25	121.349223

En el grupo de administración intravenosa PBS + administración intraperitoneal de anticuerpo M30 (PBS + grupo de administración M30), el crecimiento del tumor se suprimió significativamente como se compara con el grupo de administración intravenosa PBS + administración intraperitoneal PBS (PBS + grupo de administración PBS) que sirve como el control negativo. Para ser más específico, el valor P para el PBS + grupo de administración M30 comparado con el PBS + grupo de administración PBS en términos del volumen del tumor en el día 36 fue $P < 0.05$ (El valor P se calculó usando prueba t de Student.). Además, la relación de la inhibición del crecimiento del tumor ($= 100 - (\text{volumen del tumor promedio en el PBS + grupo de administración M30}) / (\text{volumen del tumor promedio en el PBS + grupo de administración PBS}) \times 100$) en el día 36 fue 49.8% (Tabla 2).

Por otro lado, en el grupo de administración intravenosa de liposoma encapsulada de clodronato +

administración intraperitoneal PBS (Clod lip (clodronato liposoma) + grupo de administración PBS) y el grupo de administración intravenosa de liposoma encapsulada de clodronato + administración intraperitoneal de anticuerpo M30 (Clod lip + grupo de administración M30), la supresión del crecimiento de tumor no se observó. Para ser más específico, los valores P para el Clod lip + grupo de administración PBS y el Clod lip + grupo de administración M30 comparado con el PBS + grupo de administración PBS en términos del volumen del tumor en el día 36 fueron $P=0.52$ y $P=1$, respectivamente. (Los valores P se calcularon usando prueba t de Student). Además, las relaciones de inhibición del crecimiento del tumor ($= 100 - (\text{volumen del tumor promedio en Clod lip + grupo de administración PBS o Clod lip + grupo de administración M30}) / (\text{volumen del tumor promedio en PBS + grupo de administración PBS}) \times 100$) en el día 36 fueron -21.2% y -1.4% , respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2

Relación de la inhibición del crecimiento del tumor (%)	En el día 8	En el día 15	En el día 22	En el día 29	En el día 36
Clod lip + grupo de administración PBS	-6.6	-39.4	-12.6	-3.5	-21.2
PBS + grupo de administración M30	17.5	36.4	52.8	49.7	49.8

Clod lip + grupo de administración M30	3.2	-8.6	2.6	-6.6	-1.4
---	-----	------	-----	------	------

5

De los resultados de arriba, se mostró que el efecto antitumor del anticuerpo M30 se suprimió al administrar liposomas encapsuladas de clodronato, y por lo tanto, se reveló que el efecto antitumor del anticuerpo M30 es principalmente un efecto mediado por macrófagos.

10

Ejemplo 6. Clonación de cADN M30 de anticuerpo de ratón y determinación de secuencia

6)-1 Determinación de las secuencias de aminoácidos de N-terminal de cadenas ligeras y pesadas de M30 de anticuerpo de ratón

15

Con objeto de determinar las secuencias de aminoácidos de N-terminal de las cadenas ligeras y pesadas del M30 de anticuerpo de ratón, el M30 de anticuerpo de ratón purificado en el Ejemplo 3)-6 se separó por SDS-PAGE. La proteína en el gel se transfirió del gel después de la separación a una membrana PVDF (tamaño del poro: 0.45 μ m, fabricado por Invitrogen Corporation). La membrana se lavó con una solución amortiguadora de lavado (NaCl 25 mM, solución amortiguadora de borato de sodio 10 mM pH 8.0), y después de eso se tiñó al sumergirse en una solución de pigmento (metanol al 50%, ácido acético 20%, azul brillante Coomassie 0.05%) durante 5 minutos, seguido por desteñido con metanol al 90%. Se extirparon las porciones de la banda corresponden a la cadena pesada (la banda con movilidad más pequeña) y la banda corresponde a la cadena ligera (la banda con movilidad más

20

25

grande) visualizadas en la membrana PVDF.

La porción de la banda correspondiente a la cadena ligera se incubó a 37°C durante 30 minutos en una cantidad pequeña de una solución de polivinilpirrolidona al 0.5%/ácido acético 100 mM, seguido por pozo de lavado con agua. Posteriormente, el residuo de N-terminal modificado se removi6 usando Kit de Aminopeptidasa de Piroglutamato Pfu (TaKaRa Bio, Inc.), seguido por lavado con agua y secado con aire. Luego, se hizo un intento para identificar secuencias de aminoácidos de N-terminal respectivas por un método Edman automático (ver Edman et al. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80) usando Procise (marca registrada) Modelo Secuenciador de Proteína cLC 492cLC (Applied Biosystems, Inc.).

Como un resultado, la secuencia de aminoácidos de N-terminal de la banda correspondiente a la cadena pesada del M30 de anticuerpo de rat6n se determin6 para ser EVQLQQSGPE (SEQ ID NO: 44 en el Listado de Secuencias), y la secuencia de aminoácidos de N-terminal de la banda correspondiente a la cadena ligera de la misma se determin6 para ser IVLSQSPTILSASP (SEQ ID NO: 45 en el Listado de Secuencias).

6)-2 Preparaci6n de mARN de hbridoma que produce M30 de anticuerpo de rat6n

Con objeto de clonar cADNs que codifican cada una de la cadena pesada y la cadena ligera del M30 de anticuerpo de rat6n, mARN se prepar6 a partir del hibridoma que produce M30 de anticuerpo de rat6n usando Kit de Purificaci6n mARN Quick Prep (GE Healthcare Corporation).

6)-3 Clonaci6n de cADN de anticuerpo M30 de rat6n y determinaci6n de secuencia

Con referencia a los hallazgos de que los isotipos de

las cadenas ligeras y pesadas del M30 de anticuerpo de ratón son $\gamma 2a$ y κ encontrados en el Ejemplo 3)-5, y las secuencias de aminoácidos de N-terminal de las cadenas ligeras y pesadas determinadas en el Ejemplo 1-1), y la base de datos de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos (ver Kabat, E. A. et al., (1991) in Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. I y II, U.S. Department of Health and Human Services), diversos cebadores de oligonucleótido que hibridizan a cada una de la región de terminal 5' de una región que codifica el gen de anticuerpo y la región de terminal 3' de los mismos que comprende un codón de paro se sintetizaron, y un cADN que codifica la cadena pesada y un cADN que codifica la cadena ligera se amplificaron usando el mRNA preparado en el Ejemplo 6-2) y Kit PCR de ARN de una etapa TaKaRa (AMV) (TaKaRa Bio, Inc.). Como un resultado, el cADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo y el cADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo pueden amplificarse por los siguientes conjuntos de Cebador.

Conjunto de cebador para la cadena pesada

Cebador 16

5'-aagaattcatgggaatggagttggata-3' (SEQ ID NO: 46 en el Listado de Secuencias)

Cebador 17

5'-aagatatctcatttaccggagtcggggagaa-3' (SEQ ID NO: 47 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebador para la cadena ligera

Cebador 18

5'-aagaattcatggattttctggtgcag-3' (SEQ ID NO: 48 en el Listado de Secuencias)

Cebador 19

5'-aagatatcttaacactcattcctgttgaagct-3' (SEQ ID NO: 49 en el Listado de Secuencias)

5 Cada uno del cADN que codifica la cadena pesada y el cADN que codifica la cadena ligera amplificada por PCR se clonó usando Kit de Expresión pEF6/V5-His TOPO TA (Invitrogen Corporation), y cada una las secuencias de nucleótido de la cadena pesada y la cadena ligera clonada se determinó usando un analizador de secuencia de gen ("Analizador de ADN ABI PRISM 3700; Applied Biosystems" o "Analizador 3730xl Applied Biosystems; Applied Biosystems"). En la reacción de
10 procesamiento de secuencia, se usó GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Inc.).

15 La secuencia de nucleótido determinada del cADN que codifica la cadena pesada del M30 de anticuerpo de ratón está representada por la SEQ ID NO: 50 en el Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 51. Además, las secuencias de SEQ ID NOS: 50 y 51 se muestran en las Figs. 21-1 a 21-2.

20 La secuencia de nucleótido determinada del cADN que codifica la cadena ligera del M30 de anticuerpo de ratón está representada por la SEQ ID NO: 52 en el Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NOS: 52 y 53 se muestran
25 en las Figs. 22-1 a 22-2.

Además, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera se analizaron por comparación usando KabatMan (ver PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133), que es la base de datos de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos. Como un

resultado, se encontró que en la cadena pesada del M30 de anticuerpo de ratón, la secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 51 en el Listado de Secuencias es la región variable. También se encontró que en la cadena ligera del M30 de anticuerpo de ratón, la secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 23 hasta 130 en la SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias es la región variable.

Ejemplo 7. Producción de M30 de anticuerpo quimérico (anticuerpo cM30)

7)-1 Producción de vectores de expresión pEF6KCL y pEF1FCCU universales

7)-1-1 Construcción del vector de expresión pEF6KCL de cadena ligera humanizada y quimérica

Al realizar PCR usando un pEF6/V5-HisB plásmido (Invitrogen Corporation) como una plantilla y también usando los siguientes cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN de inmediatamente corriente debajo de BGHpA (Posición de la secuencia: 2174) para SmaI (Posición de la secuencia: 2958) (un fragmento de ADN que comprende el origen fl de replicación y el promotor SV40 y origen, de aquí en adelante referido como "fragmento A").

Cebador 20

5'-ccacgcgccctgtagcggcgcatcattaagc-3' (SEQ ID NO: 54 en el Listado de Secuencias)

Cebador 21

5'-aaacccgggagcctttttgcaaaagcctagg-3' (SEQ ID NO: 55 en el Listado de Secuencias)

El fragmento A obtenido y un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 56, de aquí en adelante referido como "fragmento B", la

secuencia de SEQ ID NO: 56 también se muestra en la Fig. 23) que comprende una secuencia de ADN que codifica una señal secretoria de cadena κ humana, una región constante de cadena κ humana, y una señal adicional de poli-A humana se ligaron una con la otra por PCR de extensión de traslape. El
 5 fragmento de ADN de esta manera obtenido en el cual el fragmento A y el fragmento B se ligaron uno con el otro se digirió con las enzimas de restricción KpnI y SmaI, que se ligó a un pEF6/V5-HisB plásmido (Invitrogen Corporation) el cual se digirió con la enzimas de restricción KpnI y SmaI,
 10 por ello se construyó un vector de expresión pEF6KCL de cadena ligera humanizado y quimérico que tiene una secuencia de señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena κ humana, y una secuencia de señal adicional poli-A humana corriente abajo del promotor EF1.

15 7)-2 Construcción de pEF1KCL

Un fragmento de ADN obtenido al escindir el pEF6KCL obtenido por el método descrito arriba con las enzimas de restricción KpnI y SmaI se ligó a pEF1/myc-HisB (Invitrogen Corporation) que se digirió con KpnI y SmaI, por ello se
 20 construyó un pEF1KCL plásmido.

7)-3 Construcción del vector de expresión pEF1FCCU de cadena pesada humanizado y quimérico

Un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 57, la secuencia de SEQ ID NO: 57 también se muestra en la Fig. 24) que comprende una
 25 secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de una secuencia de señal y una región constante de IgG1 humano se digirió con las enzimas de restricción NheI y PmeI y se ligó al pEF1KCL plásmido que se digirió con NheI y PmeI, por ello se construyó un vector de expresión pEF1FCCU de cadena pesada

quimérico y humanizado que tiene una secuencia de señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena pesada humana, y una secuencia de señal adicional poli-A humana corriente abajo del promotor.

5 7)-4 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo quimera M30

Al usar el cADN que codifica la cadena ligera del M30 de anticuerpo de ratón como una plantilla y también usando KOD-Plus- (TOYOBO, Co., Ltd.) y el siguiente conjunto de cebador, se amplificó una región que comprende el cADN que
10 codifica la región de cadena ligera variable. Un fragmento de ADN obtenido al escindir el producto amplificado con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado y quimérico universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las
15 enzimas de restricción NdeI y BsiWI, por ello se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo quimera M30. El vector de esta manera obtenido de expresión se nombró "pEF6KCL/M30L". La secuencia de nucleótido de la cadena ligera tipo quimera M30 está representada por la SEQ ID NO:
20 58 en el Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 59. Las secuencias de SEQ ID NOS: 58 y 59 se muestran en las Figs. 25-1 a 25-2. Incidentalmente, un residuo de treonina en la
25 posición 128 en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo cM30 representada por la SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias se ubica en la C-terminalarboxilo de la región variable de cadena ligera y corresponde a un residuo de alanina en la posición 130 en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo M30 cadena ligera representada por

la SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias, sin embargo, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 59, el residuo ya se ha sustituido con un residuo de treonina derivado de una cadena ligera de anticuerpo humano.

Conjunto cebador para la cadena ligera

5

Cebador 22

5'-aaacatatggccaaattgttctctcccagtcctccaacaatcc-3' (SEQ ID NO: 60 en el Listado de Secuencias)

Cebador 23

10

5'-aaacgtacgtttcagctccagcttggtcccagttaccg-3' (SEQ ID NO: 61 en el Listado de Secuencias)

7)-5 Construcción del vector de expresión de cadena pesada tipo quimera M30

15

Al usar el cADN que codifica la cadena pesada del M30 de anticuerpo de ratón como una plantilla, un fragmento de ADN obtenido al realizar PCR usando KOD-Plus- (TOYOBO, Co., Ltd.) y el siguiente conjunto de cebador A se ligó a un fragmento de ADN obtenido al realizar PCR usando el siguiente conjunto cebador B a través de la PCR de extensión de traslape usando el siguiente conjunto cebador C, por ello el

20 BspI en la región variable se removió y también una región que comprende el cADN que codifica la región variable de cadena pesada se amplificó. Un fragmento de ADN obtenido al escindir el producto amplificado con la enzima de restricción

25 BspI se insertó en el vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo humanizado y quimérico universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BspI, por ello un vector de expresión de cadena pesada de tipo quimera M30 se construyó. El vector de esta manera obtenido de expresión se nombró "pEF1FCCU/M30H".

127

La secuencia de nucleótido de la cadena pesada de tio
 quimera M30 está representada por la SEQ ID NO: 62 en el
 Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la
 misma está representada por la SEQ ID NO: 63. Además, las
 secuencias de SEQ ID NOS: 62 y 63 se muestran en las Figs.
 26-1 a 26-2.

Conjunto de Cebador A

Cebador 24

5'-aaagctgagcgagggtccagctgcagcagctctggacctgag-3' (SEQ ID NO: 64
 en el Listado de Secuencias)

Cebador 25

5'-gaggtcaggctgctgagttccatgtaggctgtgctg-3' (SEQ ID NO: 65 en
 el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebador B

Cebador 26

5'-cagcacagcctacatggaactcagcagcctgacctc-3' (SEQ ID NO: 66 en
 el Listado de Secuencias)

Cebador 27

5'-aaagctgagctgactgtgagagtggtgccttggccccag-3' (SEQ ID NO: 67
 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebador C

Cebador 28

5'-aaagctgagcgagggtccagctgcagcagctctggacctgag-3' (SEQ ID NO: 68
 en el Listado de Secuencias)

Cebador 29

5'-aaagctgagctgactgtgagagtggtgccttggccccag-3' (SEQ ID NO: 69
 en el Listado de Secuencias)

7)-6 Preparación de M30 de anticuerpo quimérico

7)-6-1 Producción de M30 de anticuerpo quimérico

Se sembraron 1.2×10^9 células de células FreeStyle

293F (Invitrogen Corporation) en la fase de crecimiento logarítmica en 1.2 L de medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen Corporation) y cultivaron durante 1 hora al agitar en 90 rpm a 37°C en una incubadora de CO₂ al 8%. Se disolvió 3.6 mg de polietilenimina (Polyscience #24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, pEF1FCCU/M30H (0.4 mg) y pEF6KCL/M30L (0.8 mg) preparados con Kit de plásmido PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Luego, se agregó 20 ml de los vectores de expresión obtenidos/líquido mezclado Opti-Pro SFM a 20 ml de la polietilenimina obtenida/líquido mezclado Opti-Pro SFM, y la mezcla resultante se agitó suavemente y luego se dejó durante 5 minutos. Después de eso, la mezcla se agregó a las células FreeStyle 293F, y el cultivo de agitación en 90 rpm se realizó durante 7 días a 37°C en una incubadora de CO₂ al 8%. El sobrenadante de cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec #CCS-045-E1H).

Un M30 de anticuerpo quimérico obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30H y pEF6KCL/M30L se nombró "cM30" o "anticuerpo cM30".

7)-6-2 Purificación de cM30

El sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 7-1) se purificó por un proceso de dos etapas incluyendo cromatografía de afinidad de Proteína A (a 4 hasta 6°C) (GE Healthcare Japan Corporation) e hidroxapatita cerámica (a temperatura ambiente). Una etapa de intercambio de solución amortiguadora después de la purificación por cromatografía de afinidad de Proteína A y después la purificación por hidroxapatita cerámica se realizó a temperatura ambiente.

Primero, 1100 hasta 1200 ml del sobrenadante de cultivo se aplicó a MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectado en serie) equilibrado con PBS. Después de que toda la solución de cultivo se vació en la columna, la columna se lavó con 15 hasta 30 ml de PBS. Posteriormente, la elución se realizó con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4.0), y una fracción que contiene el anticuerpo se recolectó. La fracción se aplicó a una columna desalada (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, dos columnas desaladas HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por ello la solución amortiguadora se intercambió con una solución amortiguadora que contiene fosfato de sodio 5 mM, MES 50 mM, y NaCl 20 mM en pH 6.5.

Además, la solución de anticuerpo sometida a intercambio de solución amortiguadora se aplicó a una columna de hidroxapatita cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., columna de hidroxapatita Bio-Scale CHT2-1 (volumen: 2 ml)) equilibrada con una solución amortiguadora que contiene NaPi 5 mM, MES 50 mM, y NaCl 20 mM en pH 6.5. Luego, se realizó la elución del gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio, y una fracción que contiene el anticuerpo se recolectó. La fracción se aplicó a una columna desalada (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, dos columnas desaladas HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por ello el líquido se intercambió con CBS (que contiene solución amortiguadora de citrato 10 mM y cloruro de sodio 140 mM, pH 6.0).

Finalmente, la solución resultante se concentró usando Dispositivo de Filtro UF Centrífugo VIVASPIN 20 (peso

molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 4°C), y la concentración de IgG se ajustó hasta 1.0 mg/ml o más, y la solución de esta manera obtenida se usó como una muestra purificada.

Ejemplo 8. Actividad de anticuerpo cM30

8)-1 Actividad de enlace del anticuerpo cM30 a B7-H3

La afinidad entre el anticuerpo M30 o el anticuerpo cM30 y el antígeno B7-H3 se midió por un dispositivo de resonancia de plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) (GE Healthcare Corporation). De acuerdo con procedimientos comunes, un IgG anti-ratón o un anticuerpo IgG anti-humano se inmovilizó en un chip de sensor, y luego, la muestra de anticuerpo M30 o el anticuerpo cM30 se enlazó a esto. Después de eso, un polipéptido de dominio extracelular de un antígeno de variante 2 B7-H3 recombinante (fabricado por R&D Systems, Inc., #2318-B3-050/CF) se agregó a esto en diferentes concentraciones, y la cantidad del antígeno enlazado al anticuerpo en una solución amortiguadora de corrida (solución amortiguadora de fosfato, SP20 0.05%) se midió con el paso del tiempo. La cantidad medida se analizó con software dedicado (BIAevaluation Versión 4.1, GE Healthcare Corporation) y una constante de disociación se calculó.

Como un resultado, el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 se encontraron para tener enlace al antígeno B7-H3 recombinante con una constante de disociación de 5.89 nM y 3.43 nM, respectivamente. De estos resultados, se confirmó que el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 enlazado al antígeno B7-H3 y sus afinidades de enlace fueron sustancialmente iguales.

8)-2 Actividad ADCP de anticuerpo cM30

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de un sujeto saludable se aislaron de acuerdo con procedimientos comunes y suspendieron en FCS al RPMI-10% (Invitrogen Corporation) y luego se sembraron en un matraz. Las células se cultivaron durante la noche en una incubadora CO₂. El sobrenadante de cultivo se removió, y se agregó a las células unidas al matraz, FCS al RPMI-10% complementado con M-CSF y GM-CSF (PeproTech, Inc.), y las células se cultivaron durante 2 semanas. Las células se separaron con TrypLE y recolectaron. Luego, las células se agregaron a una placa de 24 pozos en 500 µl/pozo (1×10^5 células/pozo) y cultivaron durante la noche a 37°C. Las células de esta manera preparadas se usaron as células efectoras.

El etiquetado de las células NCI-H322 a usarse como células objetivo se realizó usando kit de etiquetado de pigmento PKH26 (Sigma Co., Ltd.). Las células objetivo se separaron con TrypLE y lavaron dos veces con PBS. Las células se suspendieron en Diluyente C en 1×10^7 células/ml. Se diluyó solución madre del pigmento PKH26 (1 mM) hasta 8 µM con diluyente C, e inmediatamente después de eso, la solución del pigmento diluido se agregó a esto en una cantidad igual a aquella de la suspensión celular. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, 1 ml de suero se agregó a esto, y además, un medio con suero se agregó a esto, y se realizó el lavado dos veces.

Cada uno del anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 se diluyó hasta 20 µg/ml con una solución de cultivo. Posteriormente, las células objetivo se suministraron a 2×10^6 células/100 µl/tubo y mezclaron. La mezcla resultante se

BZ

dejó reposar en hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se
removió, y las células se lavaron dos veces con una solución
de cultivo y suspendieron en 500 μ l de una solución de
cultivo. El sobrenadante se removió de las células efectoras,
y las células que se han tratado con el anticuerpo y
suspendieron en la solución de cultivo se agregaron a esto y
mezclaron con esto. Luego, las células se cultivaron durante
3 horas en una incubadora CO₂. Después de eso, las células se
separaron con Tripsina-EDTA y recolectaron. A las células
recolectadas, un anticuerpo CD11b anti-ratón etiquetado FITC
(Becton, Dickinson y Company, Ltd.) se agregó, y la mezcla
resultante se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. El
sobrenadante se removió, y las células se lavaron dos veces
con una solución de cultivo. Las células recolectadas se
suspendieron en 300 μ l de un medio de cultivo y analizaron
por FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company, Ltd.). En
los macrófagos CD11b-positivos, una fracción PKH26-positiva
se evaluó como células de fagocitosis-positivas.

Como un resultado, como se muestra en la Fig. 8, cuando
el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 se agregaron en 10
 μ g/ml, los fagocitosis de las células NCI-H322 por macrófagos
se indujeron hasta $33 \pm 1\%$ y $35 \pm 2\%$, respectivamente. En
consecuencia, se mostró que el anticuerpo cM30 tiene una
actividad ADCP contra las células NCI-H322 de la misma manera
como el anticuerpo M30. Un resultado experimental similar se
obtuvo también para una actividad ADCP contra células MDA-MB-
231 (ATCC).

8)-3 Efecto antitumor *in vivo* del anticuerpo cM30

Las células MDA-MB-231 se separaron de un matraz de
cultivo por un tratamiento de tripsina, y luego se

suspendieron en RPMI 1640 que contiene medio FBS al 10% (Invitrogen Corporation), seguido por centrifugación y el sobrenadante se removi6. Las c6lulas se lavaron dos veces con el mismo medio, y luego se suspendieron en Matriz de Membrana BD Matrigel Basement (fabricado por BD Biosciences, Inc.).
5 Luego, las c6lulas se implantaron subcut6neamente en la regi6n axiliar de cada rat6n (CB17/Icr-Prkdc[scid]/CrlCrlj, Charles River Laboratories Japan, Inc.) de 6 semanas de edad en una dosis de 5×10^6 c6lulas/rat6n. El d6a del implante se tom6 como el d6a 0, y en los d6as 14, 21, 28, 35, y 42, el
10 anticuerpo M30 o el anticuerpo cM30 se administr6 intraperitonealmente en una dosis de 500 μ g/rat6n (alrededor de 25 mg/kg). El volumen del tumor se midi6 en los d6as 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 42, 46, 49, y 52, y el efecto antitumor de la administraci6n del anticuerpo se examin6.

15 Como un resultado, en los grupos de administraci6n del anticuerpo M30 y cM30, el crecimiento del tumor se suprimi6 significativamente como se compara con el grupo no tratado en el cual el anticuerpo no se administr6. Los valores P para el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30 comparados con el grupo
20 no tratado en t6rmino del peso del tumor en el d6a 52 fueron ambos $P < 0.001$. Los valores P se calcularon usando prueba de comparaci6n m6ltiple de Dunnett.

25 Adem6s, la relaci6n de la inhibici6n del crecimiento del tumor ($= 100 - (\text{volumen del tumor promedio en el grupo de administraci6n del anticuerpo}) / (\text{volumen del tumor promedio en el grupo no tratado}) \times 100$) en el d6a 52 fue 71.3% en el caso de el anticuerpo M30 y 71.7% en el caso del anticuerpo cM30. En consecuencia, el anticuerpo cM30 se observ6 para tener un efecto antitumor muy fuerte *in vivo* de la misma

manera como el anticuerpo M30 (Fig. 9).

Ejemplo 9. Diseño de anticuerpo humanizado de anticuerpo B7-H3 anti-humano de ratón #M30

9)-1 Diseño de anticuerpo M30 humanizado

9)-1-1 Modelado molecular de las regiones variables M30

5 El modelado molecular de las regiones variables M30 se realizó de acuerdo con un método generalmente conocido como modelado de homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Las secuencias primarias (estructuras
10 tridimensionales derivadas de las estructuras de cristal de rayos X están disponibles) de las regiones variables de la inmunoglobulina humana registrada en Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)) se compararon con las regiones variables M30 determinadas en el Ejemplo 6-3).

15 Como un resultado, 3BKY se seleccionó como una secuencia que tiene la homología de secuencia más alta con la región variable de cadena ligera M30 entre los anticuerpos que similarmente tienen una eliminación en la estructura. Además, se seleccionó 3DGG como una secuencia que tiene la
20 homología de secuencia más alta con la región variable de cadena pesada M30.

25 La estructura tridimensional de una región de estructura se preparó con base en un "modelo de estructura" al combinar los coordenados de 3BKY correspondiente a la cadena ligera M30 con los coordenados de 3DGG correspondientes a la cadena pesada M30. Como para las CDRs M30, como los coordenados que definen las conformaciones más similares a aquellas de CDRH1 (SEQ ID NO: 92), CDRH2 (SEQ ID NO: 93), CDRH3 (SEQ ID NO: 94), CDRL1 (SEQ ID NO: 95), CDRL2 (SEQ ID NO: 96), y CDRL3 (SEQ ID NO: 97) de acuerdo con la

clasificación de Thornton et al. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)) y las reglas H3 (FEBS letters 399, 1-8 (1996)), 2HOJ, 1BBD, 1Q90, 2FBJ, 1LNK, y 1TET se seleccionaron, respectivamente, e incorporaron en el modelo de estructura.

5 Finalmente, con objeto de obtener un modelo molecular posible de la región variable M30 en términos de energía, un cálculo de energía se realizó para excluir contacto interatómico desventajoso. El procedimiento de arriba se llevó a cabo usando la el programa de predicción de
10 estructura terciaria de proteína comercialmente disponibles Prime y el programa de búsqueda coordinado MacroModel (Schrodinger, LLC).

9)-1-2 Diseño de la secuencia de aminoácidos de M30 humanizado

15 Un anticuerpo M30 humanizado se construyó de acuerdo con un método generalmente conocido como injerto CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86, 10029-10033 (1989)).

Un anticuerpo aceptador se seleccionó con base en la homología del aminoácido dentro de la región de estructura. La secuencia de la región de estructura de M30 se comparó con
20 todas las secuencias de estructura humana en la base de datos Kabat (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)) de las secuencias de aminoácidos de anticuerpo. Como un resultado, un anticuerpo mAb49'CL (GenBank en NCBI: D16838.1 y D16837.1) se
25 seleccionó como un aceptador con base en una homología secuencia de 70% en la región de estructura.

Los residuos de aminoácido en la región de estructura de mAb49'CL se alinearon con los residuos de aminoácido de M30, y las posiciones donde diferentes aminoácidos se usaron fueron idénticas. Las posiciones de estos residuos se

analizaron usando el modelo tridimensional de M30 construido arriba. Luego, los residuos donadores a ser injertados en el aceptador se seleccionaron de acuerdo con los criterios proporcionados por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86, 10029-10033 (1989)). Al transferir algunos residuos donadores seleccionados al anticuerpo aceptador, las secuencias humanizadas se construyeron como se describe en el siguiente Ejemplo.

9)-2 Humanización de cadena pesada M30

9)-2-1 Cadena pesada tipo M30-H1:

Una cadena pesada M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 35 (alanina), 39 (metionina), 57 (lisina), 59 (lisina), 67 (isoleucina), 86 (lisina), 87 (alanina), 89 (glutamina), 91 (serina), 93 (lisina), 95 (serina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina), y 137 (leucina) de la cadena pesada cM30 representada por la SEQ ID NO: 63 en el Listado de Secuencias con glutamina, valina, alanina, valina, lisina, serina, valina, arginina, alanina, metionina, arginina, valina, isoleucina, alanina, ácido glutámico, treonina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se nombró "cadena pesada tipo M30-H1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo M30-H1 está representada por la SEQ ID NO: 85.

9)-2-2 Cadena pesada tipo M30-H2:

Una cadena pesada M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 35 (alanina), 39

(metionina), 57 (lisina), 59 (lisina), 86 (lisina), 87 (alanina), 89 (glutamina), 91 (serina), 93 (lisina), 95 (serina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina), y 137 (leucina) de la cadena pesada cM30 representada por la SEQ ID NO: 63 en el Listado de Secuencias con glutamina, valina, alanina, valina, lisina, serina, valina, arginina, alanina, arginina, valina, isoleucina, alanina, ácido glutámico, treonina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se nombró "cadena pesada tipo M30-H2".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo M30-H2 está representada por la SEQ ID NO: 87.

9)-2-3 Cadena pesada tipo M30-H3:

Una cadena pesada M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 35 (alanina), 39 (metionina), 59 (lisina), 89 (glutamina), 91 (serina), 93 (lisina), 95 (serina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina), y 137 (leucina) de la cadena pesada cM30 representada por la SEQ ID NO: 63 en el Listado de Secuencias con valina, alanina, valina, lisina, serina, valina, alanina, isoleucina, alanina, ácido glutámico, treonina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se nombró "cadena pesada tipo M30-H3".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo M30-H3 está representada por la SEQ ID NO: 89.

9)-2-4 Cadena pesada tipo M30-H4:

Una cadena pesada M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 35 (alanina), 39 (metionina), 59 (lisina), 95 (serina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina), y 137 (leucina) de la cadena pesada cM30

representada por la SEQ ID NO: 63 en el Listado de Secuencias con valina, alanina, valina, lisina, serina, valina, alanina, treonina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se nombró "cadena pesada tipo M30-H4".

5 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo M30-H4 está representada por la SEQ ID NO: 91.

9)-3 Humanización de cadena ligera M30

9)-3-1 Cadena ligera tipo M30-L1:

10 Una cadena ligera M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 21 (glutamina), 25 (serina), 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62 (serina), 64 (lisina), 65 (prolina), 66 (triptofano), 77 (valina), 89 (serina), 90 (tirosina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina), y 125 (leucina) de la cadena ligera cM30 representada por la SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias con ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, leucina, isoleucina, 15 ácido aspártico, fenilalanina, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina, y isoleucina, respectivamente, se nombró "cadena ligera tipo M30-L1".

20

25 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L1 está representada por la SEQ ID NO: 71.

9)-3-2 Cadena ligera tipo M30-L2:

Una cadena ligera M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 21 (glutamina), 25 (serina), 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62

(serina), 64 (lisina), 65 (prolina), 77 (valina), 89 (serina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina), y 125 (leucina) de la cadena ligera cM30 representada por la SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias con ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina, y isoleucina, respectivamente, se nombró "cadena ligera tipo M30-L2".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L2 está representada por la SEQ ID NO: 73.

9)-3-3 Cadena ligera tipo M30-L3:

Una cadena ligera M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 62 (serina), 65 (prolina), 77 (valina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina), y 125 (leucina) de la cadena ligera cM30 representada por la SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias con alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, alanina, leucina, isoleucina, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina, y isoleucina, respectivamente, se nombró "cadena ligera tipo M30-L3".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L3 está representada por la SEQ ID NO: 75.

9)-3-4 Cadena ligera tipo M30-L4:

Una cadena ligera M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 21 (glutamina), 25 (serina), 29

(treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62 (serina), 64 (lisina), 66 (triptofano), 77 (valina), 89 (serina), 90 (tirosina), 91 (serina), 96 (arginina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina), y 125 (leucina) de la cadena ligera cM30 representada por la SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias con ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, fenilalanina, treonina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina, y isoleucina, respectivamente, se nombró "cadena ligera tipo M30-L4".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L4 está representada por la SEQ ID NO: 77.

9)-3-5 Cadena ligera tipo M30-L5:

Una cadena ligera M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 62 (serina), 77 (valina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina), y 125 (leucina) de la cadena ligera cM30 representada por la SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias con alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, alanina, isoleucina, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina, y isoleucina, respectivamente, se nombró "cadena ligera tipo M30-L5".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L5 está representada por la SEQ ID NO: 79.

9)-3-6 Cadena ligera tipo M30-L6:

Una cadena ligera M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 21 (glutamina), 25 (serina), 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62 (serina), 64 (lisina), 66 (triptofano), 77 (valina), 89 (serina), 90 (tirosina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina), y 125 (leucina) de la cadena ligera cM30 representada por la SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias with ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, fenilalanina, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina, glutamina, valina, y isoleucina, respectivamente, se nombró "cadena ligera tipo M30-L6".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L6 está representada por la SEQ ID NO: 81.

9)-3-7 Cadena ligera tipo M30-L7:

Una cadena ligera M30 humanizada diseñada al sustituir números de aminoácido 21 (glutamina), 25 (serina), 29 (treonina), 30 (isoleucina), 33 (alanina), 38 (lisina), 39 (valina), 41 (metionina), 42 (treonina), 61 (serina), 62 (serina), 64 (lisina), 66 (triptofano), 77 (valina), 89 (serina), 91 (serina), 97 (valina), 99 (alanina), 102 (alanina), 104 (treonina), 119 (treonina), 123 (leucina), y 125 (leucina) de la cadena ligera cM30 representada por la SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias con ácido glutámico, treonina, alanina, treonina, leucina, arginina, alanina, leucina, serina, glutamina, alanina, arginina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, treonina, leucina, prolina, fenilalanina, valina,

glutamina, valina, y isoleucina, respectivamente, se nombró "cadena ligera tipo M30-L7".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo M30-L7 está representada por la SEQ ID NO: 83.

(Ejemplo 10) Producción de anticuerpo humanizado

5

10)-1 Construcción de vectores de expresión de cadena ligera tipo M30-L1, M30-L2, M30-L3, M30-L4, M30-L5, M30-L6, y M30-L7

Los ADNs que comprenden un gen que codifican una región variable de cadena ligera tipo M30-L1, M30-L2, M30-L3, M30-L4, M30-L5, M30-L6, o M30-L7 representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 71, números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 73, números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 75, números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 77, números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 79, números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 81, o números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 83 en el Listado de Secuencias se sintetizaron (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service) con base en las SEQ ID NOS: 70, 72, 74, 76, 78, 80, y 82 de acuerdo con las secuencias de nucleótido correspondientes a las SEQ ID NOS de arriba de acuerdo con las secuencias de aminoácidos. Luego, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos al escindir los ADNs sintetizados con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo humanizado y quimérico universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, por ello se construyeron vectores de expresión de cadena ligera tipo M30-L1, M30-L2, M30-L3, M30-L4, M30-L5, M30-L6, y M30-L7.

Los vectores de expresión de esta manera obtenidos se

nombraron "pEF6KCL/M30-L1", "pEF6KCL/M30-L2", "pEF6KCL/M30-L3", "pEF6KCL/M30-L4", "pEF6KCL/M30-L5", "pEF6KCL/M30-L6", y "pEF6KCL/M30-L7", respectivamente.

10)-2 Construcción de vectores de expresión de cadena pesada tipo M30-H1, M30-H2, M30-H3, y M30-H4

5 Los ADNs que comprenden un gen que codifica una región variable de cadena pesada tipo M30-H1, M30-H2, M30-H3, o M30-H4 representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85, números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 87, números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 89, o números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 91 en el Listado de Secuencias se sintetizaron (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service) con base en la SEQ ID NO: 84, 86, 88, y 90 de acuerdo con las secuencias de nucleótido correspondientes a las SEQ ID NOS de arriba de acuerdo con las secuencias de aminoácidos. Luego, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos al escindir los ADNs sintetizados con la enzima de restricción BspI se insertó en el vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BspI, por ello se construyeron vectores de expresión de cadena pesada tipo M30-H1, M30-H2, M30-H3, y M30-H4.

Los vectores de expresión de esta manera obtenidos se nombraron "pEF1FCCU/M30-H1", "pEF1FCCU/M30-H2", "pEF1FCCU/M30-H3", y "pEF1FCCU/M30-H4", respectivamente.

10)-3 Producción de anticuerpo humanizado

Se sembraron 1.2×10^9 células de células FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) en la fase de crecimiento logarítmico en 1.2 L de Medio de Expresión FreeStyle 293 fresco (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora por agitación en 90

rpm a 37°C en una incubadora de CO₂ al 8%. Se disolvieron 3.6 mg de polietilenimina (Polyscience #24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, un vector de expresión de cadena pesada (0.4 mg) y un vector de expresión de cadena ligera (0.8 mg) preparados con el Kit de plásmido PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Luego, 20 ml de los vectores de expresión obtenidos/líquido mezclado con Opti-Pro SFM se agregó a 20 ml de la polietilenimina obtenida/líquido mezclado con Opti-Pro SFM, y la mezcla resultante se agitó suavemente y luego se dejó durante 5 minutos. Después de eso, la mezcla se agregó a las células FreeStyle 293F, y el cultivo de agitación en 90 rpm se realizó durante 7 días a 37°C en una incubadora de CO₂ al 8%. El sobrenadante de cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec #CCS-045-E1H).

Un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L1 se nombró "M30-H1-L1", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L2 se nombró "M30-H1-L2", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L3 se nombró "M30-H1-L3", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L4 se nombró "M30-H1-L4", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H4 y pEF6KCL/M30-L1 se nombró "M30-H4-L1", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H4 y pEF6KCL/M30-L2 se nombró "M30-H4-L2", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H4 y pEF6KCL/M30-L3 se nombró

"M30-H4-L3", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H4 y pEF6KCL/M30-L4 se nombró "M30-H4-L4", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L5 se nombró "M30-H1-L5", un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L6 se nombró "M30-H1-L6", y un anticuerpo humanizado de M30 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/M30-H1 y pEF6KCL/M30-L7 se nombró "M30-H1-L7".

10) -4 Purificación de anticuerpo humanizado

El sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 6-1) se purificó por un proceso de dos etapas que incluye cromatografía por afinidad de Proteína A (a 4 hasta 6°C) e hidroxapatita cerámica (a temperatura ambiente). Un intercambio de la etapa de solución amortiguadora después de la purificación por cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación por hidroxapatita cerámica se realizó a temperatura ambiente.

Primero, 1100 hasta 1200 ml del sobrenadante de cultivo se aplicó a MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectado en serie) equilibrado con PBS. Después de que toda la solución de cultivo se vació en la columna, la columna se lavó con 15 hasta 30 ml de PBS. Posteriormente, la elución se realizó con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4.0), y una fracción que contiene el anticuerpo se recolectó. La fracción se aplicó a una columna desalada (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desaladas HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por ello la solución amortiguadora se intercambió con una solución

amortiguadora que contiene fosfato de sodio 5 mM, MES 50 mM, y NaCl 20 mM en pH 6.5.

Además, la solución de anticuerpo sometida a intercambio de solución amortiguadora se aplicó a una columna de hidroxapatita cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., columna de hidroxapatita CHT2-1 Bio-Scale (volumen: 2 ml)) equilibrada con una solución amortiguadora que contiene NaPi 5 mM, MES 50 mM, y NaCl 20 mM e pH 6.5. Luego, se realizó la elución de gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio, y una fracción que contiene el anticuerpo se recolectó.

La fracción se aplicó a una columna desalada (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desaladas HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por ello el líquido se intercambió con CBS (que contiene solución amortiguadora de citrato 10 mM y cloruro de sodio 140 mM, pH 6.0).

Finalmente, la solución resultante se concentró usando Dispositivo de Filtro UF Centrífugo VIVASPIN 20 (peso molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 4°C), y la concentración de IgG se ajustó hasta 1.0 mg/ml o más, y la solución de esta manera obtenida se usó como una muestra purificada.

10)-5 Propiedad de enlace del anticuerpo humanizado a antígeno B7-H3

La propiedad de enlace del anticuerpo M30 humanizado a B7-H3 humano que es un antígeno se midió por un dispositivo de resonancia de plasmón de superficie (SPR) (Biacore, Inc.). De acuerdo con procedimientos comunes, un anticuerpo IgG anti8-humano se inmovilizó en un chip de sensor, y luego, cada una de las muestras purificadas de los anticuerpos M30

humanizados obtenidos en el 10)-4 de arriba se enlazó a esto. Después de eso, un polipéptido de dominio extracelular del antígeno de variante 2 B7-H3 (fabricado por R&D Systems, Inc., #2318-B3-050/CF) se agregó a esto en diferentes concentraciones, y la cantidad del antígeno enlazado al anticuerpo en una solución amortiguadora de corrida (solución amortiguadora de fosfato, SP20 al 0.05%) se midió con el paso del tiempo. La cantidad medida se analizó con software dedicado (BIAevaluation) y se calculó una constante de disociación (K_d [M]). La medición se realizó usando el anticuerpo cM30 como un control positivo para cada operación de medición. Los resultados son como se muestran en la Tabla 3. Todos de los anticuerpos M30 humanizados tienen actividad de enlace contra el antígeno B7-H3.

Tabla 3

	K_d [M]
M30-H1-L1	8.7E-08
M30-H1-L2	1.0E-07
M30-H1-L3	1.0E-07
M30-H1-L4	1.6E-08
M30-H4-L1	1.3E-07
M30-H4-L2	1.4E-07
M30-H4-L3	1.6E-07
M30-H4-L4	1.2E-08
M30-H1-L5	1.9E-09
M30-H1-L6	3.4E-09
M30-H1-L7	2.7E-09
cM30	7.3E-10

Ejemplo 11. Medición de las actividades inhibitoras

competitivas de anticuerpo cM30 y anticuerpo M30 humanizado contra el anticuerpo M30 para el enlace a antígeno B7-H3

Las actividades inhibidoras competitivas del anticuerpo cM30 y el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) contra el anticuerpo M30 para el enlace a la variante 1 y variante 2 B7-H3 se midieron por el siguiente método.

Al usar kit de biotinilación EZ-Link Sulfo-NHS-LC (fabricado por Thermo Scientific Corporation, #21435) y de acuerdo con el protocolo anexo, los anticuerpos monoclonales M30 de ratón respectivos se biotinilaron (de aquí en adelante los anticuerpos M30 biotinilados respectivos se refirieron como "bM30"). Además, como una solución amortiguadora a usarse en el siguiente método ELISA, se usó BD OPTI EIA (BD Biosciences, Inc., #550536) en todos los casos.

Cada uno del polipéptido de dominio extracelular de la variante 1 B7-H3 (fabricado por R&D Systems, Inc., #1949-B3-050/CF) y el polipéptido de dominio extracelular de la variante 2 B7-H3 (fabricado por R&D Systems, Inc., #2318-B3-050/CF) se diluyó hasta 0.5 µg/ml con una solución amortiguadora de recubrimiento y la solución resultante se dosificó en 100 µL/pozo en una inmunoplaaca (fabricado por Nunc, Inc., #442404). Luego, la placa se dejó reposar durante la noche a 4°C, por ello la proteína se adsorbió a la placa. Al siguiente día, un diluyente de ensayo se dosificó en 200 µL/pozo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas.

Después de que la solución en cada pozo se removió, una solución mezclada del anticuerpo biotinilado en 5 µg/ml y un anticuerpo no etiquetado en cada concentración (0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, o 125 µg/ml) se dosificó

en 100 μ L/pozo en un diluyente de ensayo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después de que cada pozo se lavó dos veces con una solución amortiguadora de lavado, un conjugado de peroxidasa de raíz de rábano de estreptavidina (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, #RPN1231V) diluido hasta 500 veces con un diluyente de ensayo se agregó a 100 μ L/pozo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después de que la solución en cada pozo se removió y cada pozo se lavó dos veces con una solución amortiguadora de lavado, una solución de sustrato se agregó a 100 μ L/pozo, y una reacción de desarrollo de color se permitió para proceder mientras se agita la mezcla de reacción. Después de la terminación del desarrollo de color, una solución amortiguadora de bloqueo se agregó a esto en 100 μ L/pozo para detener la reacción de desarrollo de color. Luego, una absorbancia en 450 nm se midió usando un lector de placa.

Como un resultado, la absorbancia del pozo para la cual sólo bM30 se agregó fue 2.36 ± 0.05 (desviación media $\pm$ estándar (n=12)) en la placa a la cual el polipéptido del dominio extracelular de la variante 1 B7-H3 se unió, y 1.90 ± 0.20 (desviación media $\pm$ estándar (n=12)) en la placa a la cual el polipéptido del dominio extracelular de la variante 2 B7-H3 se unió.

Las absorbancias en las gráficas de las Figs. 10-1 a 10-2 son cada una expresadas como una desviación media $\pm$ estándar (n=3). El IgG de control no inhibe el enlace de bM30 a B7-H3.

Por otro lado, se mostró que el enlace de bM30 a B7-H3

se inhibe por el anticuerpo M30 por sí mismo, el anticuerpo cM30, que es un anticuerpo quimérico del anticuerpo M30, y el M30-H1-L4, que es un anticuerpo humanizado, en ambos de la placa al cual el polipéptido del dominio extracelular de la variante 1 B7-H3 se unió y la placa a la cual el polipéptido del dominio extracelular de la variante 2 B7-H3 se unió.

Esto es, se mostró que el anticuerpo cM30 y el anticuerpo humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) reconocen el mismo epítipo del antígeno B7-H3 como el anticuerpo M30.

Ejemplo 12. Actividad del anticuerpo M30 humanizado

12)-1 Actividad ADCP de anticuerpo M30 humanizado

Los PBMCs de un sujeto saludable se aislaron de acuerdo con procedimientos comunes y suspendieron en RPMI-FCS al 10% y luego sembraron en un matraz. Las células se cultivaron durante la noche en una incubadora CO₂. El sobrenadante de cultivo se removió, y se agregó a las células unidas al matraz, RPMI-FCS al 10% complementado con M-CSF y GM-CSF (PeproTech, Inc.), y las células se cultivaron durante 2 semanas. Las células se separaron con TrypLE y recolectaron. Luego, las células se agregaron a una placa de 24 pozos en 500 µl/pozo (1 x 10⁵ células/pozo) y se cultivaron durante la noche a 37°C. Las células de esta manera preparadas se usaron como células efectoras.

El etiquetado de las células NCI-H322 a usarse como células objetivo se realizó usando kit de etiquetado de pigmento PKH26 (Sigma Co., Ltd.). Las células objetivo se separaron con TrypLE y lavaron dos veces con PBS. Las células se suspendieron en Diluyente C en 1 x 10⁷ células/ml. Se diluyó solución madre de pigmento PKH26 (1

mM) hasta 8 μ M con diluyente C, e inmediatamente después de eso, la solución del pigmento diluido se agregó a esto en una cantidad igual a la de la suspensión celular. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, 1 ml de suero se agregó a esto, y además, un medio con suero se agregó a esto, y se realizó el lavado dos veces.

Cada uno del anticuerpo M30, el anticuerpo cM30, y el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) se diluyó hasta 20 μ g/ml con RPMI-FCS al 10% (Invitrogen Corporation). Posteriormente, las células objetivo (NCI-H322 células) se suministraron a 2×10^6 células/100 μ l/tubo y mezclaron. La mezcla resultante se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se removió, y las células se lavaron dos veces con una solución de cultivo y suspendieron en 500 μ l de una solución de cultivo.

El sobrenadante se removió de las células efectoras, y las células que se han tratado con el anticuerpo M30, el anticuerpo cM30, o el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) y suspendieron en la solución de cultivo se agregaron a esto y mezclaron con esto. Luego, las células se cultivaron durante 3 horas en una incubadora CO₂.

Después de eso, las células se separaron con Tripsina-EDTA y se recolectaron.

A las células recolectadas, se agregó un anticuerpo CD11b anti-ratón etiquetado FITC (Becton, Dickinson and Company, Ltd.), y la mezcla resultante se dejó reposar en hielo durante 30 minutos.

El sobrenadante se removi6, y las células se lavaron dos veces con una solución de cultivo.

Las células recolectadas se suspendieron en 300 µl de un medio de cultivo y analizaron por FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company, Ltd.). En los macrófagos CD11b-positivos, una fracción PKH26-positiva se evaluó como células de fagocitosis-positivas.

Los resultados se muestran en la Fig. 11.

En el grupo con la adición del anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4), actividad ADCP contra las células NCI-H322 se observó de la misma manera como en los grupos con la adición del anticuerpo M30 o el anticuerpo cM30.

12)-2 Actividad ADCC de anticuerpo M30 humanizado

Los PBMCs de un sujeto saludable se aislaron de acuerdo con procedimientos comunes y suspendieron en RPMI-FCS al 10% y luego se sembraron en un matraz. Las células se cultivaron durante la noche en una incubadora CO₂.

Las células flotantes se recolectaron, seguido por un procedimiento de lavado, y las células resultantes se usaron como linfocitos de sangre periférica (PBLs). Los PBLs obtenidos se suspendieron en RPMI 1640 libre de rojo fenol (fabricado por Invitrogen Corporation) que contiene suero de bovino Fetal al 10% (fabricado por Invitrogen Corporation) (de aquí en adelante abreviado como "medio ADCC"), y la suspensión celular se pasó a través de un colador de células (tamaño del poro: 40 µm, fabricado por BD Biosciences, Ltd.). Luego, las células viables se contaron por un ensayo de exclusión de pigmento azul de triptano. Después de que se centrifugó la suspensión

celular del bazo, el medio se removió, y las células se volvieron a suspender en el medio ADCC a una densidad celular viable de 2.5×10^6 células/ml y usaron como células efectoras.

5 Se trataron células NCI-H322 con tripsina, y las células tratadas se lavaron con RPMI 1640 que contiene FBS al 10% y luego se volvieron a suspender en RPMI 1640 que contiene FBS al 10%. Las células (4×10^6 células) se mezclaron con cromio-51 (5550 kBq) esterilizado a través
10 de un filtro de $0.22 \mu\text{m}$, y se realizó el etiquetado durante 1 hora bajo las condiciones de 37°C y CO_2 al 5%. Las células etiquetadas se lavaron tres veces con el medio ADCC, y las células se volvieron a suspender en 2×10^5 células/ml en el medio ADCC y usaron como células objetivo.

15 Las células objetivo en una densidad celular de 2×10^5 células/ml se suministraron a 50 μl /pozo en una microplaca de fondo en forma de U de 96 pozos. 50 μl de cada uno del anticuerpo cM30 y los anticuerpos M30 humanizados (M30-H1-L4, M30-H4-L4, M30-H1-L5, M30-H1-L6, y
20 M30-H1-L7) se agregó a esto, diluido con el medio ADCC de manera que la concentración final del anticuerpo después de agregar las células efectoras fue 1, 10, 100, o 1000 ng/ml. Luego, 100 μl de las células efectoras en una
25 densidad celular de 2.5×10^6 células/ml se agregaron a esto, y las células se cultivaron durante 4 horas bajo las condiciones de 37°C y CO_2 al 5%. El sobrenadante se recolectó en un LumaPlate (fabricado por PerkinElmer, Inc.), y la radiación gamma emitida de ahí se midió usando un contador gamma. El porcentaje de lisis celular

provocada por la actividad ADCC se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Porcentaje de lisis celular (\%)} = (A-B) / (C-B) \times 100$$

A: Conteo de radiación del pozo de muestra

5 B: Conteo de emisión de radiación espontanea promedio
(de pozos a los cuales el anticuerpo y las células efectoras no se agregaron) (n=3). El mismo procedimiento como aquel para el pozo de muestra se realizó excepto que el medio ADCC se agregó en una cantidad de 50 µl al momento de agregar el anticuerpo y en una cantidad de 100
10 µl al momento de agregar las células efectoras.

C: Conteo de emisión de radiación máximo promedio (de los pozos en los cuales las células objetivo se disolvieron con un tensoactivo) (n=3). El mismo
15 procedimiento como aquel para el pozo de muestra se realizó excepto que 50 µl del medio ADCC se agregó al momento de agregar el anticuerpo y 100 µl del medio ADCC que contiene Triton X-100 al 2% (v/v) se agregó al momento de agregar las células efectoras.

20 Los resultados se muestran en la Tabla 4 y Fig. 12.

Los datos mostrados son un promedio de mediciones en triplicado, y las barras de error representan desviaciones estándares. El valor P se calculó usando prueba t de Student.

25 En el grupo con la adición del anticuerpo M30-H1-L4, la actividad ADCC se observó de la misma manera como en el grupo con la adición del anticuerpo cM30. También otros anticuerpos M30 humanizados (M30-H4-L4, M30-H1-L5, M30-H1-L6, y M30-H1-L7) se observaron para tener actividad ADCC de la misma manera.

Tabla 4

5

	1 ng/mL		10 ng/mL		100 ng/mL		1000 ng/mL	
	Promedio (%)	Desviación estándar	Promedio (%)	Desviación estándar	Promedio (%)	Desviación estándar	Promedio (%)	Desviación estándar
IgG humano	3.8	1.6	6.8	1.5	3.9	1.4	6.5	0.5
cM30	11.1	1.2	40.5	2.7	84.3	2.3	88.2	4.0
M30-H1-L4	11.5	1.0	43.1	0.1	83.6	0.7	84.7	1.0
M30-H4-L4	7.6	1.1	26.6	1.6	68.9	2.6	81.7	1.5
M30-H1-L5	9.6	1.1	30.5	2.0	67.8	5.0	78.8	3.0
M30-H1-L6	9.8	1.6	32.0	2.2	74.7	4.0	81.3	2.0
M30-H1-L7	8.3	0.7	29.4	0.7	71.7	2.0	80.7	0.7

10

12)-3 Efecto antitumor *in vivo* de anticuerpo M30 humanizado

15

20

25

Las células MDA-MB-231 se separaron de un matraz de cultivo por un tratamiento de tripsina, y luego se suspendieron en RPMI 1640 que contiene medio FBS al 10% (Life Technologies Corporation), seguido por centrifugación y el sobrenadante se removió. Las células se lavaron dos veces con el mismo medio, y luego se suspendieron en Matriz de Membrana BD Matrigel Basement (fabricado por BD Biosciences, Inc.). Luego, las células se implantaron subcutáneamente en la región axiliar de cada uno de un grupo de ratones (FOX CHASE SCID C.B.17/Icr-scid/scidJcl, CLEA Japan, Inc.) de 6 semanas de edad en una dosis de 5×10^6 células/ratón. El día del implante se tomó como el día 0, y en los días 14, 21, 28, 35, y 42, el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) se administró intraperitonealmente en una dosis de 10, 1, 0.1, o 0.01 mg/kg (alrededor de 200, 20, 2, o 0.2 µg/mouse, respectivamente). El volumen del tumor se midió en los días 14, 18, 21, 25, 28, 31, 35, 39, 42, 45, y 49, y el efecto antitumor de la administración del anticuerpo se examinó.

Como un resultado, en los grupos de administración del anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) en 10, 1, y

0.1 mg/kg, el crecimiento del tumor se suprimió significativamente como se compara con el grupo no tratado en el cual el anticuerpo no se administró. En los grupos de administración del anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) en 10, 1, y 0.1 mg/kg, la relación de la inhibición del crecimiento del tumor ($= 100 - (\text{peso del tumor promedio en el grupo de administración del anticuerpo}) / (\text{peso del tumor promedio en el grupo no tratado}) \times 100$) comparado con el grupo no tratado en término del peso de tumor en el día 49 fue 67, 54, y 51%, respectivamente, y los valores P fueron todos $P < 0.0001$. Los valores P se calcularon usando prueba de comparación múltiple de Dunnett.

Además, la relación de la inhibición del crecimiento del tumor (%) ($= 100 - (\text{volumen del tumor promedio en el grupo de administración del anticuerpo}) / (\text{volumen del tumor promedio en el grupo no tratado}) \times 100$) del anticuerpo M30-H1-L4 en el día 49 en los grupos de administración de 10, 1, 0.1, y 0.01 mg/kg fue 84, 68, 61, y 30%, respectivamente. En consecuencia, el anticuerpo M30 humanizado (anticuerpo M30-H1-L4) se observó para tener un efecto antitumor muy fuerte *in vivo* de la misma manera como el anticuerpo M30 y el anticuerpo cM30, y se confirmó que el efecto se exhibió en una manera de respuesta de dosis (Fig. 38).

Aplicabilidad Industrial

El anticuerpo anti-B7-H3 de la invención tiene actividad antitumor, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-B7-H3 puede ser un agente anticáncer.

Listado de Secuencias Libre de Texto

SEQ ID NO: 1: PCR cebador 1

157

SEQ ID NO: 2: PCR cebador 2
SEQ ID NO: 3: cebador promotor CMV: cebador 3
SEQ ID NO: 4: cebador inverso BGH: cebador 4
SEQ ID NO: 5: secuencia de nucleótido de variante 1 B7-H3
5 SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácidos de variante 1 B7-H3
SEQ ID NO: 7: PCR cebador 5
SEQ ID NO: 8: PCR cebador 6
SEQ ID NO: 9: secuencia de nucleótido de variante 2 B7-H3
SEQ ID NO: 10: secuencia de aminoácidos de variante 2 B7-H3
10 SEQ ID NO: 11: PCR cebador 7
SEQ ID NO: 12: PCR cebador 8
SEQ ID NO: 13: PCR cebador 9
SEQ ID NO: 14: PCR cebador 10
SEQ ID NO: 15: PCR cebador 11
15 SEQ ID NO: 16: PCR cebador 12
SEQ ID NO: 17: PCR cebador 13
SEQ ID NO: 18: PCR cebador 14
SEQ ID NO: 19: PCR cebador 15
SEQ ID NO: 20: secuencia de nucleótido de B7-H3 IgV1
20 SEQ ID NO: 21: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV1
SEQ ID NO: 22: secuencia de nucleótido de B7-H3 IgC1
SEQ ID NO: 23: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgC1
SEQ ID NO: 24: secuencia de nucleótido de B7-H3 IgV2
SEQ ID NO: 25: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV2
25 SEQ ID NO: 26: secuencia de nucleótido de B7-H3 IgC2
SEQ ID NO: 27: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgC2
SEQ ID NO: 28: secuencia de nucleótido de B7-H3 IgC1-V2-C2
SEQ ID NO: 29: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgC1-V2-C2
SEQ ID NO: 30: secuencia de nucleótido de B7-H3 IgV2-C2
SEQ ID NO: 31: secuencia de aminoácidos de B7-H3 IgV2-C2

SEQ ID NO: 32: secuencia de nucleótido de B7RP-1
SEQ ID NO: 33: secuencia de aminoácidos de B7RP-1
SEQ ID NO: 34: secuencia de nucleótido de B7-H1
SEQ ID NO: 35: secuencia de aminoácidos de B7-H1
5 SEQ ID NO: 36: secuencia de nucleótido de B7-DC
SEQ ID NO: 37: secuencia de aminoácidos de B7-DC
SEQ ID NO: 38: secuencia de nucleótido de CD80
SEQ ID NO: 39: secuencia de aminoácidos de CD80
SEQ ID NO: 40: secuencia de nucleótido de CD86
10 SEQ ID NO: 41: secuencia de aminoácidos de CD86
SEQ ID NO: 42: secuencia de nucleótido de B7-H4
SEQ ID NO: 43: secuencia de aminoácidos de B7-H4
SEQ ID NO: 44: secuencia de aminoácidos de N-terminal de
cadena pesada M30 de anticuerpo de ratón
15 SEQ ID NO: 45: secuencia de aminoácidos de N-terminal de
cadena ligera M30 de anticuerpo de ratón
SEQ ID NO: 46: PCR cebador 16
SEQ ID NO: 47: PCR cebador 17
SEQ ID NO: 48: PCR cebador 18
SEQ ID NO: 49: PCR cebador 19
20 SEQ ID NO: 50: secuencia de nucleótido de cADN que codifica
la cadena pesada de anticuerpo M30
SEQ ID NO: 51: secuencia de aminoácidos de cadena pesada de
anticuerpo M30
25 SEQ ID NO: 52: secuencia de nucleótido de cADN que codifica
cadena ligera de anticuerpo M30
SEQ ID NO: 53: secuencia de aminoácidos de cadena ligera de
anticuerpo M30
SEQ ID NO: 54: PCR cebador 20
SEQ ID NO: 55: PCR cebador 21

SEQ ID NO: 56: señal secretoria de cadena κ humana que codifica la secuencia de ADN, región constante de cadena κ humana, y señal adicional de poli-A humano

5 SEQ ID NO: 57: fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de la secuencia de señal y región constante de IgG1 humano

SEQ ID NO: 58: secuencia de nucleótido de cADN que codifica la cadena ligera de tipo quimera de anticuerpo M30

10 SEQ ID NO: 59: secuencia de aminoácidos de cadena ligera de tipo quimera de anticuerpo M30

SEQ ID NO: 60: PCR cebador 22

SEQ ID NO: 61: PCR cebador 23

SEQ ID NO: 62: secuencia de nucleótido de cADN que codifica la cadena pesada de tipo quimera de anticuerpo M30

15 SEQ ID NO: 63: secuencia de aminoácidos de cadena pesada de tipo quimera de anticuerpo M30

SEQ ID NO: 64: PCR cebador 24

SEQ ID NO: 65: PCR cebador 25

SEQ ID NO: 66: PCR cebador 26

20 SEQ ID NO: 67: PCR cebador 27

SEQ ID NO: 68: PCR cebador 28

SEQ ID NO: 69: PCR cebador 29

SEQ ID NO: 70: secuencia de nucleótido de cadena ligera tipo M30-L1

25 SEQ ID NO: 71: secuencia de aminoácidos de cadena ligera tipo M30-L1

SEQ ID NO: 72: secuencia de nucleótido de cadena ligera tipo M30-L2

SEQ ID NO: 73: secuencia de aminoácidos de cadena ligera tipo M30-L2

SEQ ID NO: 74: secuencia de nucleótido de cadena ligera tipo
M30-L3

SEQ ID NO: 75: secuencia de aminoácidos de cadena ligera tipo
M30-L3

5 SEQ ID NO: 76: secuencia de nucleótido de cadena ligera tipo
M30-L4

SEQ ID NO: 77: secuencia de aminoácidos de cadena ligera tipo
M30-L4

10 SEQ ID NO: 78: secuencia de nucleótido de cadena ligera tipo
M30-L5

SEQ ID NO: 79: secuencia de aminoácidos de cadena ligera tipo
M30-L5

SEQ ID NO: 80: secuencia de nucleótido de cadena ligera tipo
M30-L6

15 SEQ ID NO: 81: secuencia de aminoácidos de cadena ligera tipo
M30-L6

SEQ ID NO: 82: secuencia de nucleótido de cadena ligera tipo
M30-L7

20 SEQ ID NO: 83: secuencia de aminoácidos de cadena ligera tipo
M30-L7

SEQ ID NO: 84: secuencia de nucleótido de cadena pesada tipo
M30-H1

SEQ ID NO: 85: secuencia de aminoácidos de cadena pesada tipo
M30-H1

25 SEQ ID NO: 86: secuencia de nucleótido de cadena pesada tipo
M30-H2

SEQ ID NO: 87: secuencia de aminoácidos de cadena pesada tipo
M30-H2

SEQ ID NO: 88: secuencia de nucleótido de cadena pesada tipo
M30-H3

SEQ ID NO: 89: secuencia de aminoácidos de cadena pesada tipo
M30-H3

SEQ ID NO: 90: secuencia de nucleótido de cadena pesada tipo
M30-H4

5 SEQ ID NO: 91: secuencia de aminoácidos de cadena pesada tipo
M30-H4

SEQ ID NO: 92: secuencia de aminoácidos de CDRH1 de
anticuerpo M30

10 SEQ ID NO: 93: secuencia de aminoácidos de CDRH2 de
anticuerpo M30

SEQ ID NO: 94: secuencia de aminoácidos de CDRH3 de
anticuerpo M30

SEQ ID NO: 95: secuencia de aminoácidos de CDRL1 de
anticuerpo M30

15 SEQ ID NO: 96: secuencia de aminoácidos de CDRL2 de
anticuerpo M30

SEQ ID NO: 97: secuencia de aminoácidos de CDRL3 de
anticuerpo M30

Se

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo caracterizado porque tiene las siguientes propiedades de:

- 5 (a) enlazarse específicamente a B7-H3;
- (b) que tiene una actividad de fagocitosis mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCP); y
- (c) que tiene una actividad antitumor *in vivo*, o un fragmento funcional del anticuerpo.

10 2. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque B7-H3 es una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 o 10.

15 3. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque se enlaza a IgC1 y/o IgC2 cada uno de los cuales es un dominio de B7-H3.

20 4. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque IgC1 es un dominio que comprende una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 140 hasta 244 en la SEQ ID NO: 6, e IgC2 es un dominio que comprende una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 358 hasta 456 en la

25 SEQ ID NO: 6.

5. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque tiene una actividad inhibidora competitiva contra el anticuerpo M30

para el enlace a B7-H3.

5 6. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque tiene una actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

10 7. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el tumor es cáncer.

15 8. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer de hígado, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer esófago, o cáncer renal.

20 9. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque comprende CDRH1 que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 92, CDRH2 que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 93, y CDRH3 que
25 consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 94 como regiones que determinan la complementariedad de la cadena pesada y comprende CDRL1 que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 95, CDRL2 que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 96, y CDRL3 que

consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 97 como regiones que determinan la complementariedad de la cadena ligera.

5 10. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 51 y una región
10 variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 23 hasta 130 en la SEQ ID NO: 53.

15 11. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque una región constante es una región constante derivada humana.

20 12. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque comprende una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 63 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 59.

25 13. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque es humanizado.

14. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque comprende: una región variable cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de (a) una secuencia de

aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85, (b) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 87, (c) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 89, (d) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 91, (e) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% o más de cualquiera de las secuencias (a) hasta (d), y (f) una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos se eliminan, sustituyen o agregan en cualquiera de las secuencias (a) hasta (d); y una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de (g) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 71, (h) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 73, (i) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 75, (j) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 77, (k) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 79, (l) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 81, (m) una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 83, (n) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% o más con cualquiera de las secuencias (g) hasta (m), y (o) una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios

aminoácidos se eliminan, sustituyen o agregan en cualquiera de las secuencias (g) hasta (m).

15. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de: una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 71; una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 73; una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 75; una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 77; una región variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta

141 en la SEQ ID NO: 85 y una región variable de cadena
ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ
ID NO: 79; una región variable de cadena pesada que consiste
de una secuencia de aminoácidos representada por números de
5 aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una región
variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de
aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta
128 en la SEQ ID NO: 81; una región variable de cadena pesada
que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por
10 números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 85 y una
región variable de cadena ligera que consiste de una
secuencia de aminoácidos representada por números de
aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 83; una región
variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de
15 aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta
141 en la SEQ ID NO: 91 y una región variable de cadena
ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos
representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ
ID NO: 71; una región variable de cadena pesada que consiste
de una secuencia de aminoácidos representada por números de
20 aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 91 y una región
variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de
aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta
128 en la SEQ ID NO: 73; una región variable de cadena pesada
que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por
25 números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 91 y una
región variable de cadena ligera que consiste de una
secuencia de aminoácidos representada por números de
aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 75; y una región

variable de cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 141 en la SEQ ID NO: 91 y una región variable de cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 128 en la SEQ ID NO: 77.

16. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 14 o 15, caracterizado porque comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de: una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 75; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 77; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de

aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 79; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 81; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 83; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 75; y una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por números de aminoácido 20 hasta 471 en la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos

representada por números de aminoácido 21 hasta 233 en la SEQ ID NO: 77.

17. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, caracterizado porque comprende una
5 cadena pesada y una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de: una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que
10 consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 75; una cadena pesada que
15 consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 77; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 79; una cadena pesada que
20 consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 81; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos
25

representada por la SEQ ID NO: 83; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 71; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 73; una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 75; y a cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 77.

18. El fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque el fragmento funcional es seleccionado del grupo que consiste de Fab, F(ab)2, Fab' y Fv.

19. Un polinucleótido caracterizado porque codifica el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

20. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 50 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 67 hasta 390 en la SEQ ID NO: 52.

21. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 19 o 20, caracterizado porque comprende una

secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 62 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 58.

22. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 19 o 20, caracterizado porque comprende: una
5 secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de (a) una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84, (b) una secuencia de nucleótido representada por los números de
10 nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 86, (c) una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 88, (d) una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90, y (e) una
15 secuencia de nucleótido que comprende un polinucleótido que hibridiza a un polinucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementario para cualquiera de las secuencias de nucleótido (a) hasta (d) bajo condiciones severas; y una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo
20 que consiste de (f) una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 70, (g) una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 72, (h) una secuencia de nucleótido representada por los números de
25 nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 74, (i) una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 76, (j) una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 78, (k) una secuencia de nucleótido representada por los números de

nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 80, (l) una
secuencia de nucleótido representada por los números de
nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 82, y (m) una
secuencia de nucleótido que comprende un polinucleótido que
hibridiza a un polinucleótido que consiste de una secuencia
de nucleótido complementaria a cualquiera de las secuencias
de nucleótido (f) hasta (l) bajo condiciones estrictas.

23. El polinucleótido de conformidad con la
reivindicación 22, caracterizado porque comprende secuencias
de nucleótido seleccionadas del grupo que consiste de: una
secuencia de nucleótido representada por los números de
nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia
de nucleótido representada por los números de nucleótido 61
hasta 384 en la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido
representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la
SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por
los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 72;
una secuencia de nucleótido representada por los números de
nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia
de nucleótido representada por los números de nucleótido 61
hasta 384 en la SEQ ID NO: 74; una secuencia de nucleótido
representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la
SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por
los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 76;
una secuencia de nucleótido representada por los números de
nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia
de nucleótido representada por los números de nucleótido 61
hasta 384 en la SEQ ID NO: 78; una secuencia de nucleótido
representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la
SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por

los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 80; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 82; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 74; y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 423 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 384 en la SEQ ID NO: 76.

24. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 22 o 23, caracterizado porque comprende secuencias de nucleótido seleccionadas del grupo que consiste de: una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por

los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 74; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 76; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 78; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 80; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 82; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 74; y una secuencia de nucleótido representada por los números de nucleótido 58 hasta 1413 en la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por los números de

nucleótido 61 hasta 699 en la SEQ ID NO: 76.

25. El polinucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, caracterizado porque comprende secuencias de nucleótido seleccionadas del grupo que consiste de: una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 74; una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 76; una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 78; una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 80; una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 82; una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 70; una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 72; una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 74; y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de nucleótido representada por la SEQ ID NO: 76.

26. Un vector de expresión caracterizado porque

comprende un polinucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25.

27. Una célula hospedera, caracterizada porque se transforma con el vector de expresión de conformidad con la reivindicación 26.

5

28. La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque es una célula eucariota.

29. Un método para producir un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, caracterizado porque al comprender una etapa de cultivo la célula hospedera de conformidad con la reivindicación 27 o 28, y una etapa de recolectar un anticuerpo deseado o un fragmento funcional del anticuerpo de un producto cultivado obtenido en la etapa de cultivo.

10

15

30. Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, caracterizado porque se obtiene por el método de producción de conformidad con la reivindicación 29.

31. El fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque el fragmento funcional se selecciona del grupo que consiste de Fab, F(ab)₂, Fab' y Fv.

20

32. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, 30, y 31, caracterizado porque la modificación de un glicano se regula para aumentar una actividad citotóxica celular dependiente del anticuerpo.

25

33. Una composición farmacéutica caracterizada porque al comprender al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de conformidad con las

reivindicaciones 1 a 18, y 30 a 32.

34. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada porque es para tratar el tumor.

5 35. Una composición farmacéutica para tratar el tumor caracterizado porque comprende al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de conformidad con las reivindicaciones 1 a 18 y 30 a 32 y al menos un agente terapéutico para cáncer.

10 36. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 34 o 35, caracterizada porque el tumor es cáncer.

15 37. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque el cáncer es cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer de hígado, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer esofágico, o cáncer renal.

20 38. Un método para tratar un tumor, caracterizado porque se administra al menos uno de los anticuerpos de conformidad con las reivindicaciones 1 a 18 y 30 32 a un individuo.

25 39. Un método para tratar un tumor, caracterizado porque se administra al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de conformidad con las reivindicaciones 1 a 18 y 30 a 32 y al menos un agente terapéutico para cáncer simultáneamente, separadamente, o secuencialmente a un individuo.

40. El método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 38 o 39, caracterizado porque el tumor es

cáncer.

41. El método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el cáncer es cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, un melanoma, cáncer de
5 hígado, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer esofágico, o cáncer renal.

10

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención actual se refiere a un anticuerpo que tiene un efecto terapéutico en un tumor. Esto es, la invención se refiere a un anticuerpo que se enlaza a B7-H3 para exhibir una actividad antitumor.

5

Un objetivo de la invención es proporcionar un fármaco que tiene un efecto terapéutico en un tumor.

Al obtener un anticuerpo anti-B7-H3 que se enlaza a B7-H3 para exhibir una actividad antitumor, se obtuvo una composición farmacéutica para tratar el tumor que comprende el anticuerpo y similares.

10

15

20

25

Fig. 1

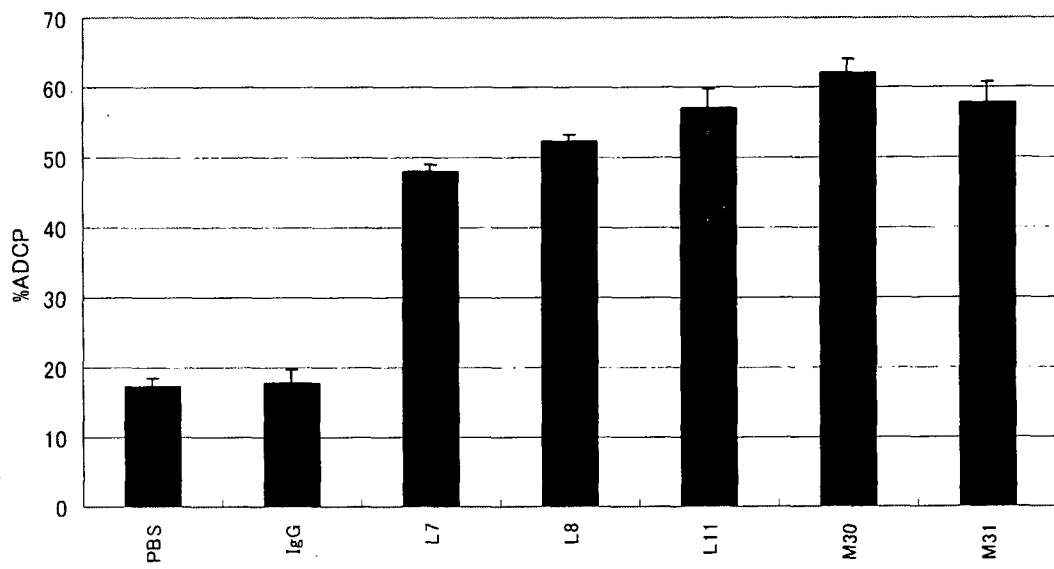


Fig. 2

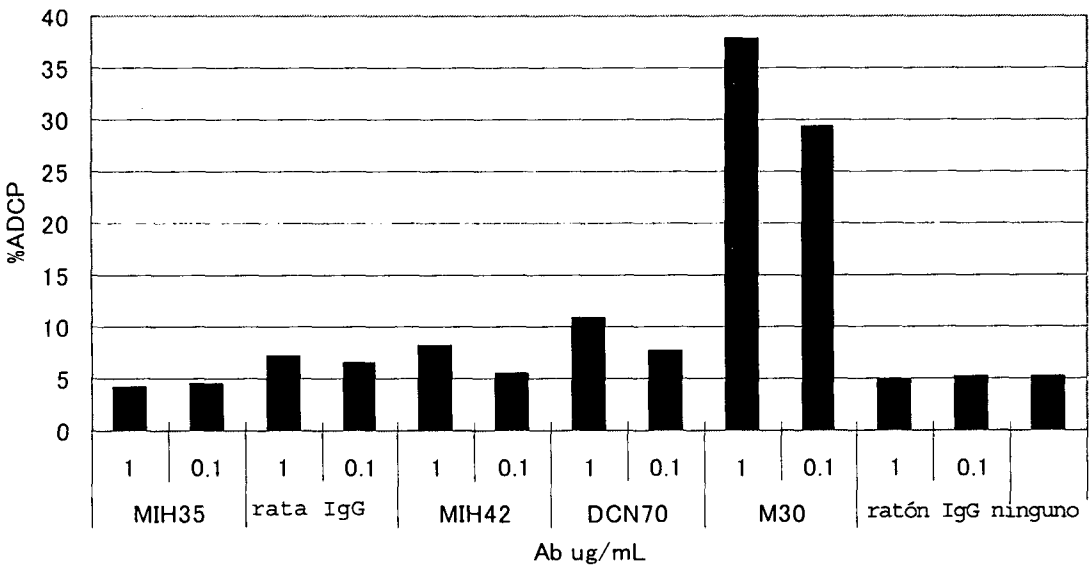


Fig. 3

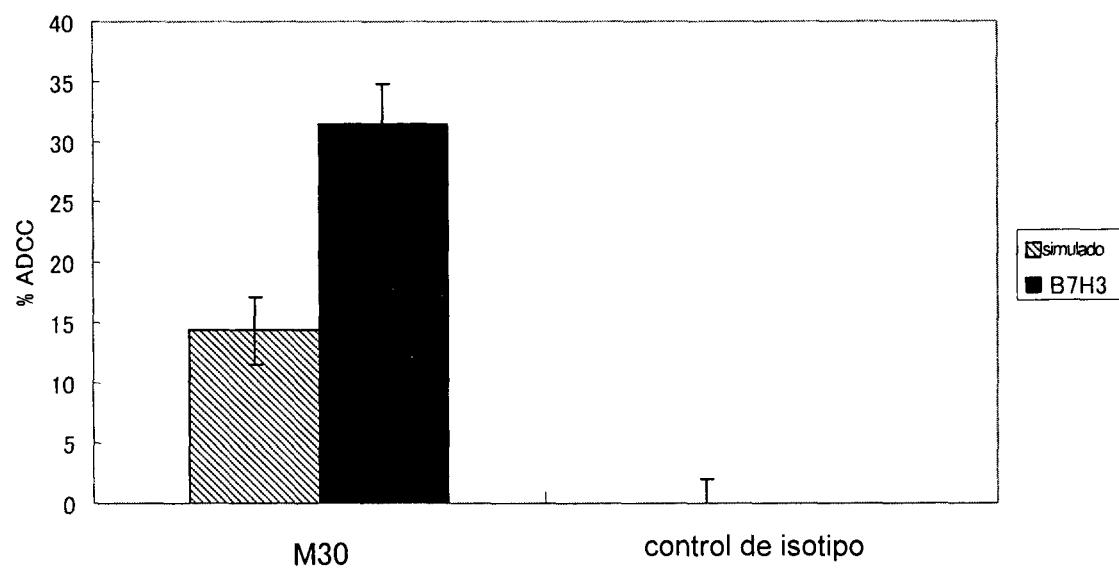


Fig. 4

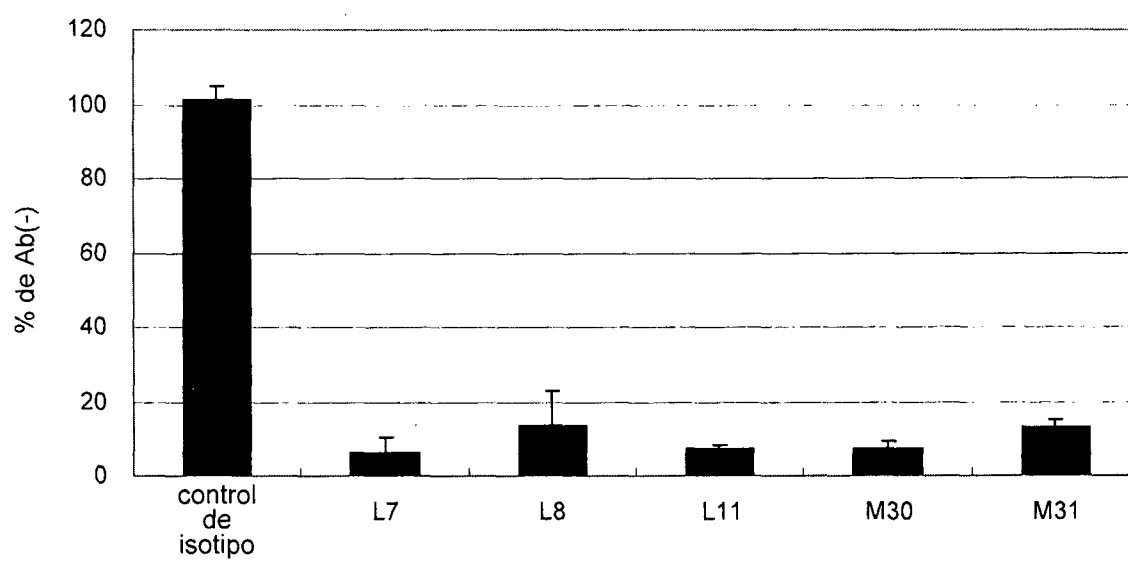


Fig. 5-1

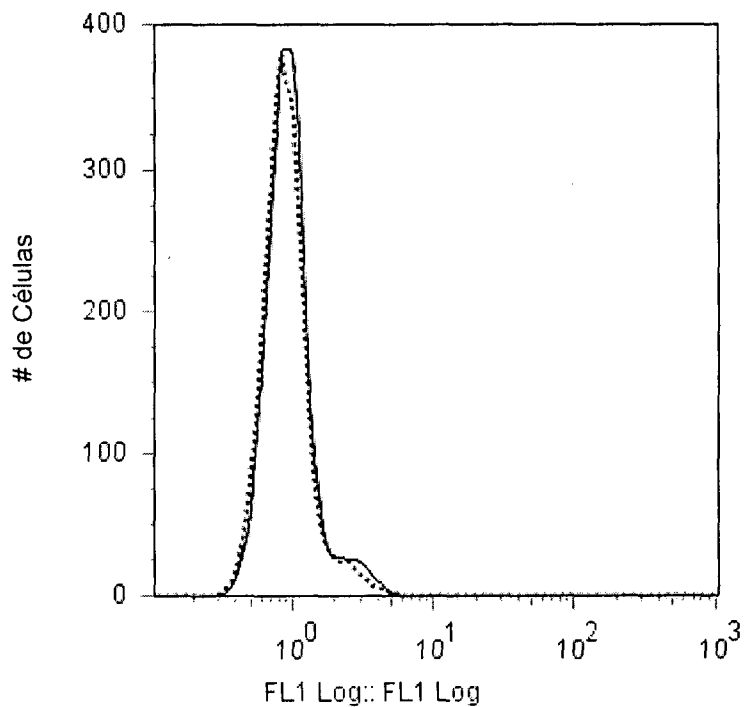


Fig. 5-2

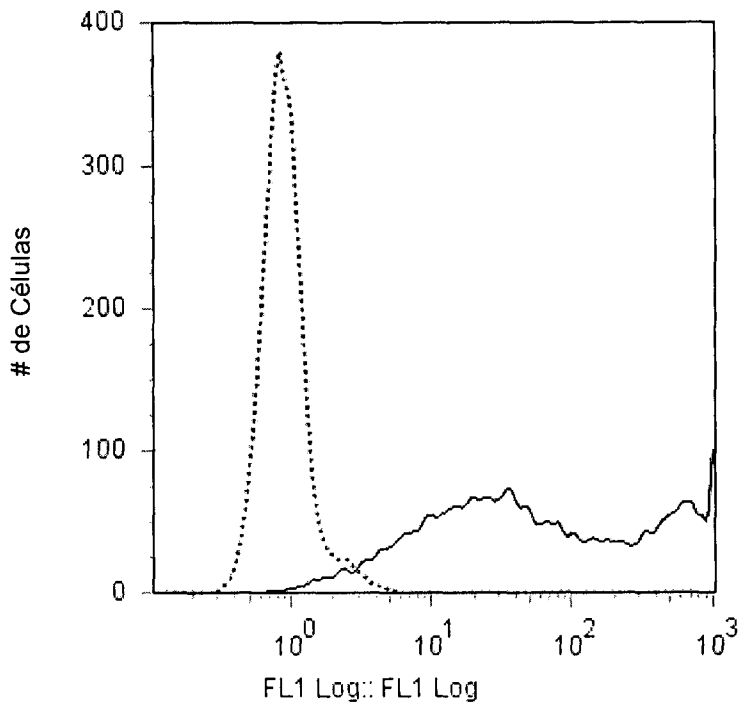


Fig. 5-3

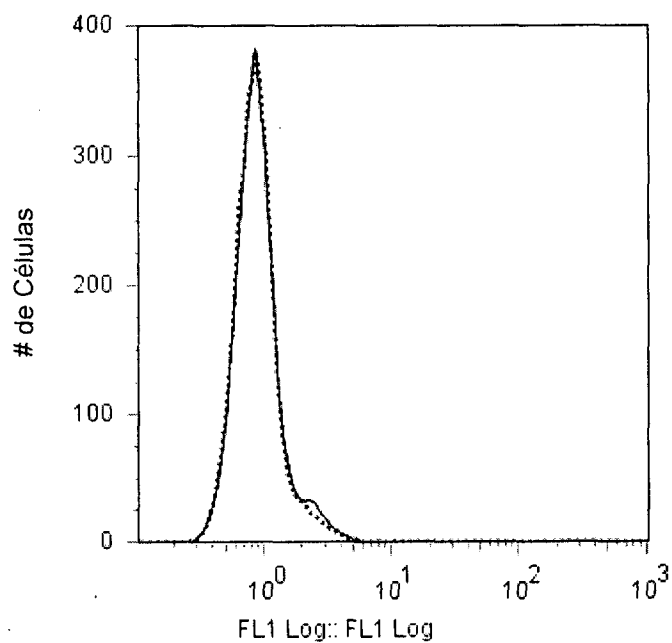


Fig. 5-4

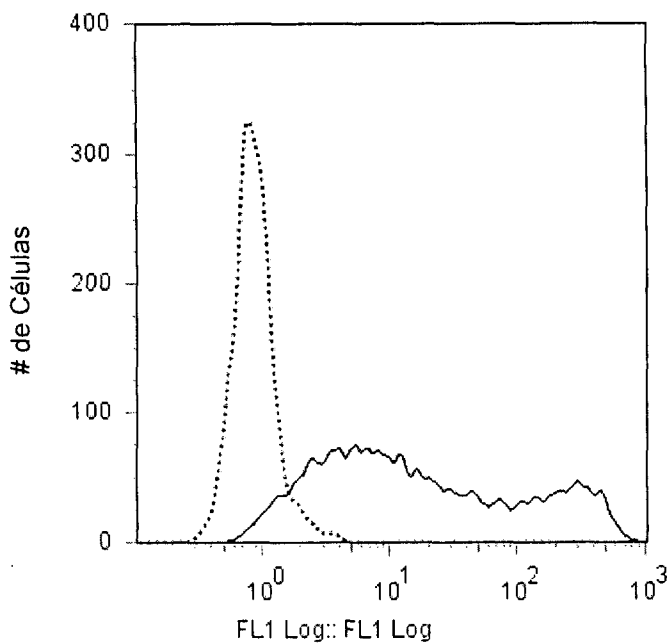


Fig. 5-5

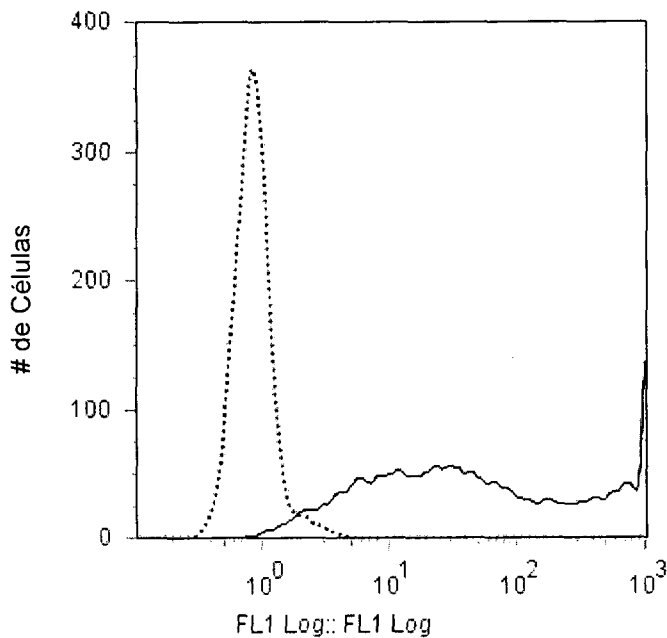


Fig. 5-6

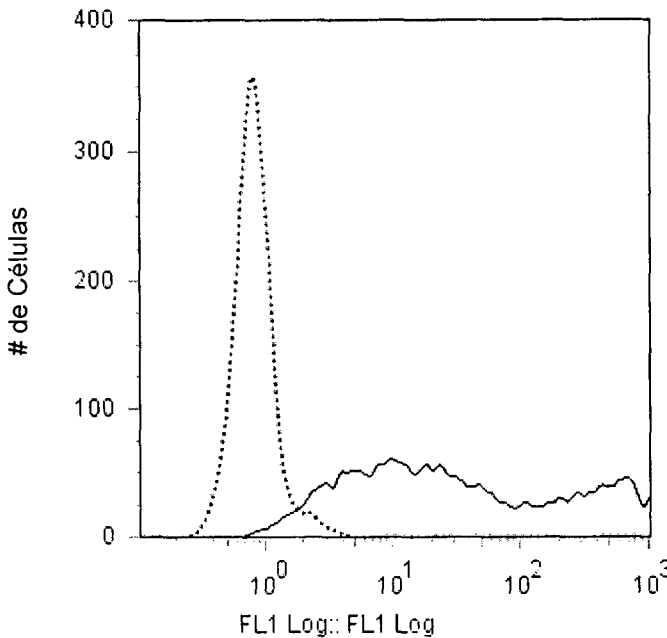


Fig. 6

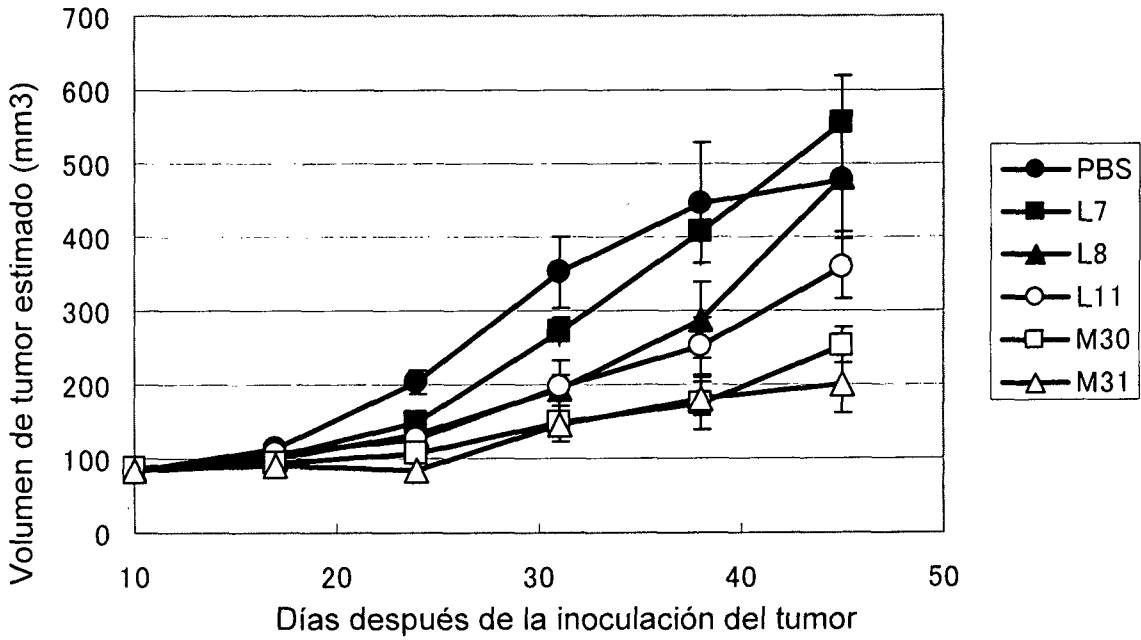


Fig. 7

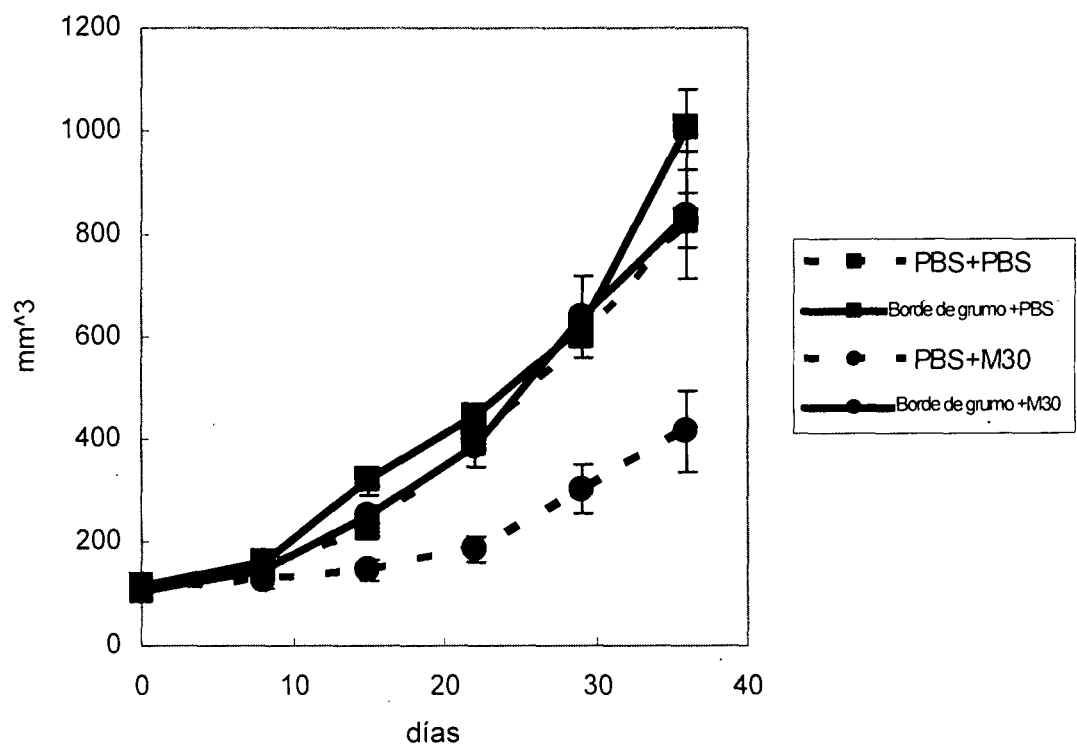


Fig. 8

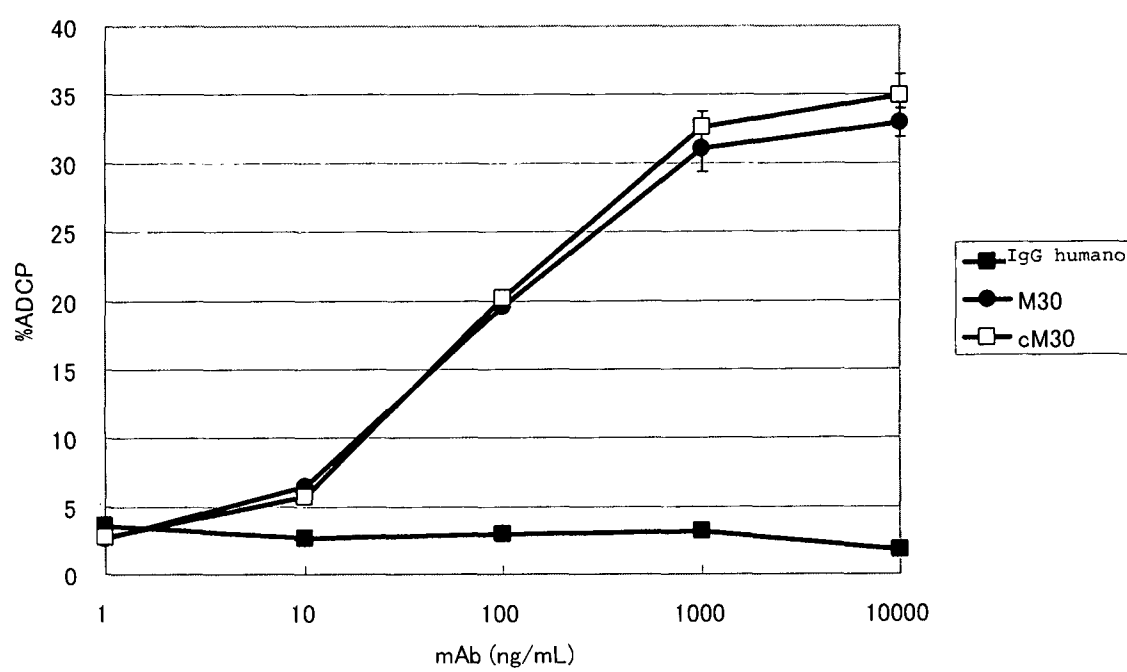


Fig. 9

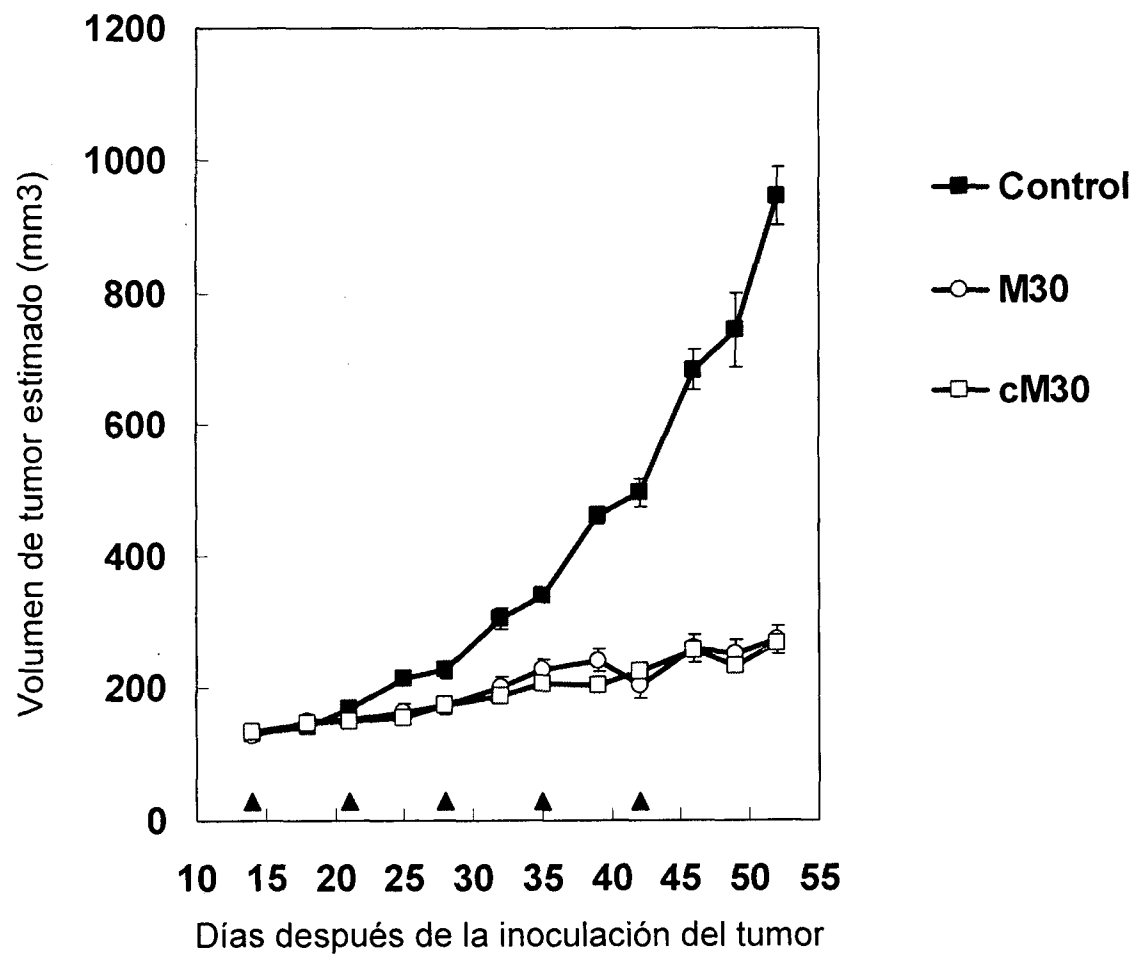


Fig. 10-1

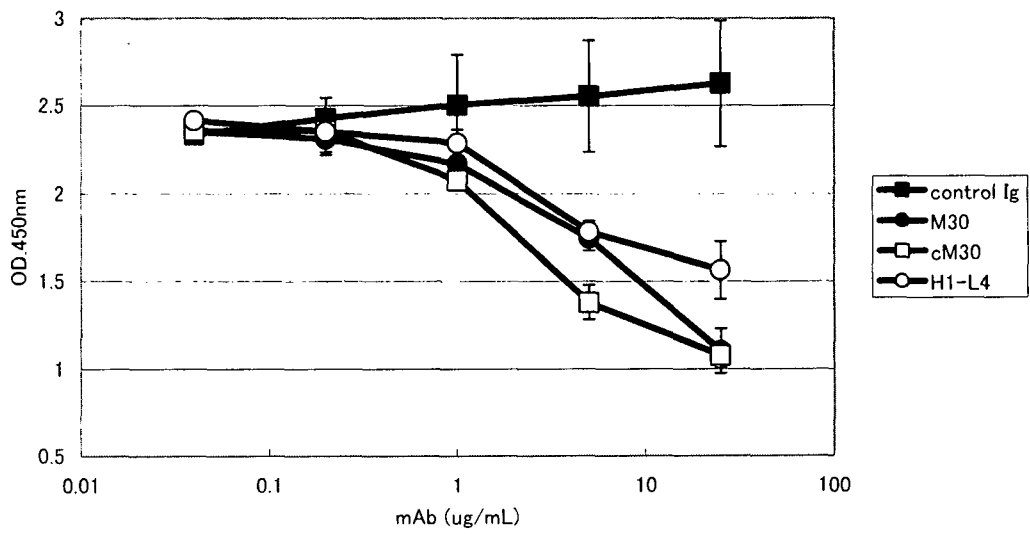


Fig. 10-2

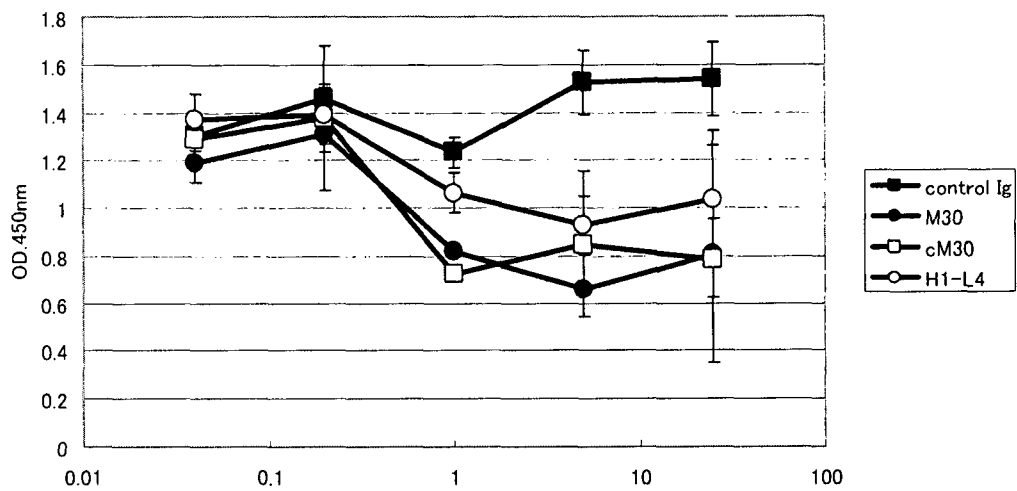
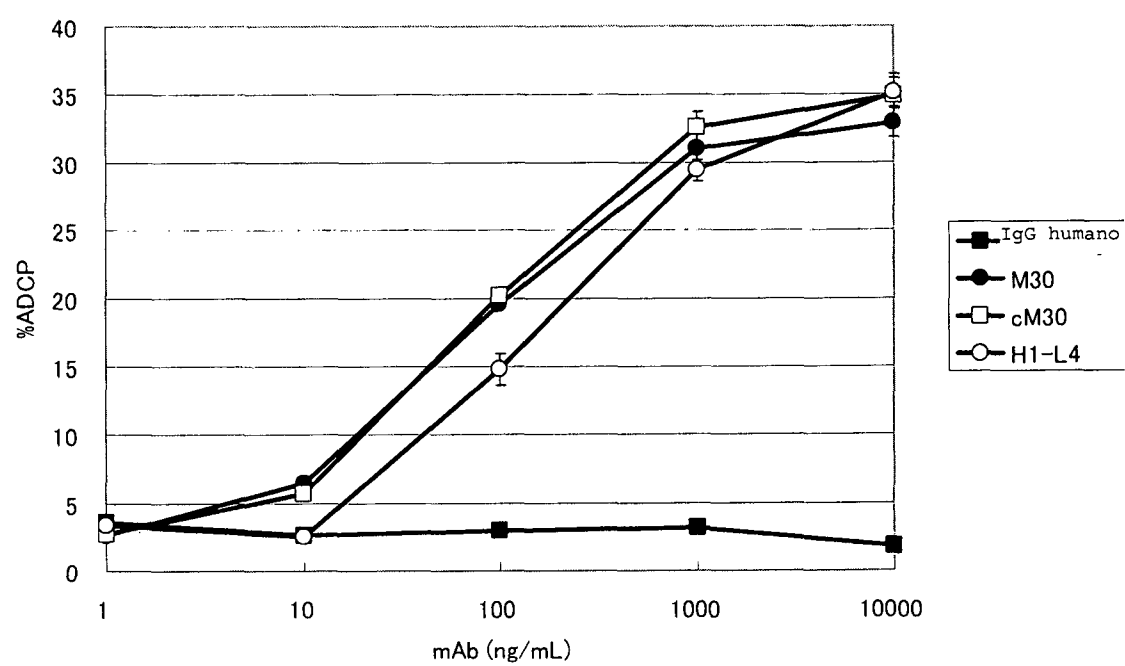


Fig. 11



144

Fig. 12

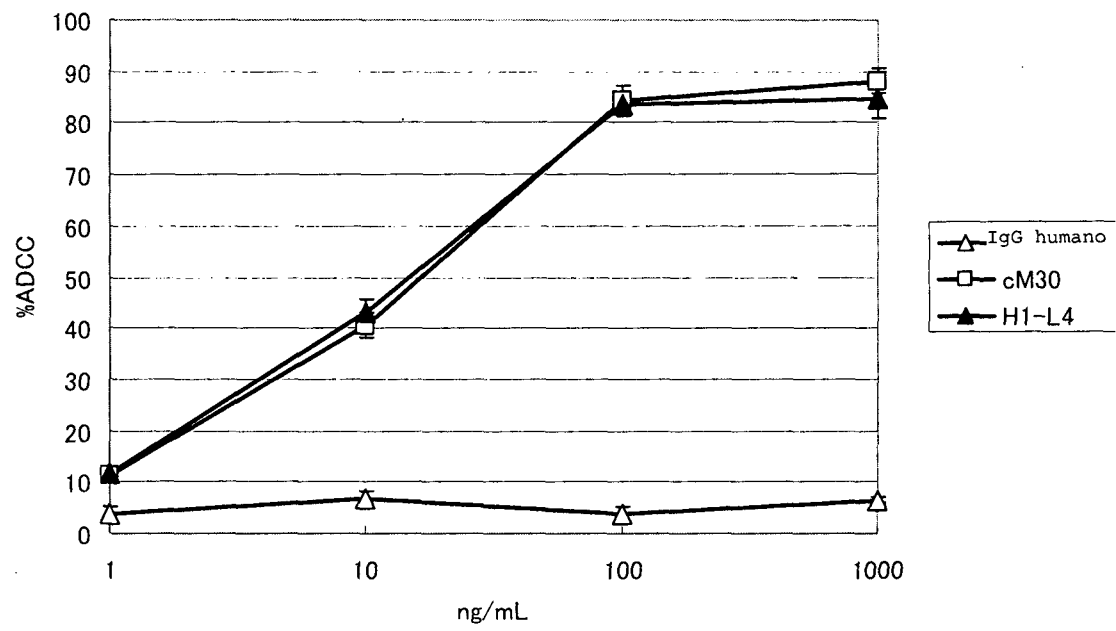


Fig. 13-1

atgctgcgtcggcggggcagccctggcatgggtgtgcatgtgggtgcagccctgggagcac
tgtggttctgcctcacaggagccctggaggtccaggtccctgaagacccagtggtggcact
ggtgggcaccgatgccaccctgtgctgctccttctccctgagcctggcttcagcctggca
cagctcaacctcatctggcagctgacagataccaaacagctggtgcacagctttgctgagg
gccaggaccagggcagcgcctatgccaaaccgcacggccctcttcccggacctgctggcaca
gggcaacgcacccctgaggctgcagcgcgtgctgtggcggacgagggcagcttcacctgc
ttcgtgagcatccgggatttcggcagcgtgccgtcagcctgcaggtggccgctccctact
cgaagcccagcatgaccctggagcccaacaaggacctgcggccaggggacacggtgacct
cacgtgctccagctaccagggctaccctgaggctgagggtgttctggcaggatgggcaggg
gtgcccctgactggcaacgtgaccacgtcgcagatggccaacgagcagggcttggttgatg
tgcacagcatcctgcgggtgggtgctgggtgcaaattggcacctacagctgcctgggtgcgca
ccccgtgctgcagcaggatgcgcacagctctgtcaccatcacaccccagagaagccccaca
ggagccgtggaggtccaggtccctgaggacccgggtgggtggccctagtgggcaccgatgcc
ccctgcgctgctccttctcccccgagcctggcttcagcctggcacagctcaacctcatctg
gcagctgacagacaccaaacagctgggtgcacagtttcaccgaaggccgggaccagggcagc
gcctatgccaaaccgcacggccctcttcccggacctgctggcacaaggcaatgcatccctga
ggctgcagcgcgtgctgtggcggacgagggcagcttcacctgcttcgtgagcatccggga
tttcggcagcgtgccgtcagcctgcaggtggccgctccctactcgaagcccagcatgacc
ctggagcccaacaaggacctgcggccaggggacacggtgacctcacgtgctccagctacc
ggggctaccctgaggctgagggtgttctggcaggatgggcaggggtgtgcccctgactggcaa
cgtgaccacgtcgcagatggccaacgagcagggcttggttgatgtgcacagcgtcctgcgg
gtgggtgctgggtgcgaatggcacctacagctgcctgggtgcgcaaccccgctgctgcagcagg
atgcgcacggctctgtcaccatcacagggcagcctatgacattccccccagaggccctgtg
ggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcaactgctgggtggccctggctttcgtgtgc
tggagaaagatcaaacagagctgtgaggaggagaatgcaggagctgaggaccaggatgggg
agggagaaggctccaagacagccctgcagcctctgaaacactctgacagcaaagaagatga
tggacaagaaatagcctgagcggccgcccactgtgctggatatctgcagaattccaccacac
tggactagtggatccgagctcggtaccaagcttaagtttaaaccgctgatcagcctcgact
gtgccttctagttgccagccatctgttggttgcccctcccccgctgccttccttgacctgg
aagggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgc

Fig. 13-2

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLA
QLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTC
FVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITITCSSYQGYPEAEVFWQDGQG
VPLTGNTTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPT
GAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGS
AYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMT
LEPNKDLRPGDTVITITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNTTTSQMANEQGLFDVHSVLR
VVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVC
WRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

Fig. 14-1

atgctgcgtcggcggggcagccctggcatgggtgtgcatgtgggtgcagccctgggagcac
 tgtgggttctgcctcacaggagccctggaggtccaggtccctgaagacccagtgggtggcact
 ggtggggcaccgatgccaccctgtgctgctccttctcccctgagcctggcttcagcctggca
 cagctcaacctcatctggcagctgacagataccaaacagctgggtgcacagctttgctgagg
 gccaggaccagggcagcgctatgccaaaccgcagggccctcttcccggacctgctggcaca
 gggcaacgcatccctgaggctgcagcgctgctgtgtggcgagcagggcagcttcacctgc
 ttctgtgagcatccgggatttcggcagcgctgccgtcagcctgcaggtggccgctccctact
 cgaagcccagcatgaccctggagcccaacaaggacctgcggccaggggacacgggtgacat
 cacgtgctccagctaccggggctaccctgaggctgagggtgttctggcaggatgggcagggt
 gtgcccctgactggcaacgtgaccacgtgcagatggccaacgagcagggttgtttgatg
 tgcacagcgctcctgcgggtggtgctgggtgcgaatggcacctacagctgcctgggtgcgcaa
 ccccgctgctgcagcaggatgcgcacggctctgtcaccatcacagggcagcctatgacattc
 ccccagaggccctgtgggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcactgctggtgg
 ccctggctttctgtgtgctggagaaagatcaaacagagctgtgaggaggagaatgcaggagc
 tgaggaccaggatggggagggagaaggctccaagacagccctgcagcctctgaaacactct
 gacagcaaagaagatgatggacaagaaatagcc

Fig. 14-2

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLA
 QLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTC
 FVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITCSSLRGYPEAEVFWQDGQG
 VPLTGNTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTF
 PPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHS
 DSKEDDGQEIA

Fig. 15-1

GGAGCCCTGGAGGTCCAGGTCCCTGAAGACCCAGTGGTGGCACTGGTGGGCACCGATGCCA
CCCTGTGCTGCTCCTTCTCCCCCTGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTG
GCAGCTGACAGATACCAAACAGCTGGTGCACAGCTTTGCTGAGGGCCAGGACCAGGGCAGC
GCCTATGCCAACCGCACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAGGGCAACGCATCCCTGA
GGCTGCAGCGCGTGCCTGTGGCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGA
TTTCGGCAGCGCTGCCGTGAGCCTGCAGGTGGCCGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAG
GCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTT
TCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAAATGCAGGAGCTGAGGACCA
GGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAA
GAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

Fig. 15-2

GALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGS
AYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAGQPMTFPPE
ALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGESESKTALQPLKHSDSK
EDDGQEIA

Fig. 16-1

GCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACA
CGGTGACCATCACGTGCTCCAGCTACCAGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGA
TGGGCAGGGTGTGCCCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGC
TTGTTTGATGTGCACAGCATCCTGCGGGTGGTGCTGGGTGCAAATGGCACCTACAGCTGCC
TGGTGCGCAACCCCGTGCTGCAGCAGGATGCGCACAGCTCTGTCACCATCACACCCAGAG
AAGCCCCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTG
TCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAAC
AGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAA
GACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCC
TGA

Fig. 16-2

APYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQG
LFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGQPMTFPPEALWVTVGL
SVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSKEDDGQEIA

Fig. 17-1

GGAGCCGTGGAGGTCCAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCGATGCCA
CCCTGCGCTGCTCCTTCTCCCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTG
GCAGCTGACAGACACCAAACAGCTGGTGCACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCAGGGCAGC
GCCTATGCCAACCGCACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAATGCATCCCTGA
GGCTGCAGCGCGTGCGTGTGGCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGA
TTTCGGCAGCGCTGCCGTGAGCCTGCAGGTGGCCGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAG
GCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTT
TCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCA
GGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAA
GAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

Fig. 17-2

GAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGS
AYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAGQPMTFPPE
ALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGELEGSKTALQPLKHSDSK
EDDGQEIA

Fig. 18-1

GCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACA
CGGTGACCATCACGTGCTCCAGCTACCGGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGA
TGGGCAGGGTGTGCCCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGC
TTGTTTGATGTGCACAGCGTCCTGCGGGTGGTGCTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCTGCC
TGGTGCGCAACCCCGTGCTGCAGCAGGATGCGCACGGCTCTGTCACCATCACAGGGCAGCC
TATGACATTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCA
CTGCTGGTGGCCCTGGCTTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGA
ATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCT
GAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

Fig. 18-2

APYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITCSSLRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQG
LFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIA
LLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

Fig. 19-1

GCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCCAACAAAGGACCTGCGGCCAGGGGACA
 CGGTGACCATCACGTGCTCCAGCTACCAGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGA
 TGGGCAGGGTGTGCCCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGC
 TTGTTTGATGTGCACAGCATCCTGCGGGTGGTGCTGGGTGCAAATGGCACCTACAGCTGCC
 TGGTGCGCAACCCCGTGCTGCAGCAGGATGCGCACAGCTCTGTACCATCACACCCAGAG
 AAGCCCCACAGGAGCCGTGGAGGTCCAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGC
 ACCGATGCCACCCTGCGCTGCTCCTTCTCCCCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCA
 ACCTCATCTGGCAGCTGACAGACACCAAACAGCTGGTGACAGTTTCACCGAAGGCCGGGA
 CCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGCACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAAT
 GCATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCGTGTGGCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGA
 GCATCCGGGATTTTCGGCAGCGCTGCCGTCAGCCTGCAGGTGGCCGCTCCCTACTCGAAGCC
 CAGCATGACCCTGGAGCCCCAACAAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTGACCATCACGTGC
 TCCAGCTACCGGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGTGTGCCCC
 TGA CTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCACAG
 CGTCCTGCGGGTGGTGCTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTG
 CTGCAGCAGGATGCGCACGGCTCTGTACCATCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAG
 AGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGC
 TTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGAC
 CAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCA
 AAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

Fig. 19-2

APYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQG
 LFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVG
 TDATA LRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGN
 ASLRLQVRVVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITC
 SSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPV
 LQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAED
 QDGEGEKSTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

Fig. 20-1

GGAGCCGTGGAGGTCCAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCGATGCCA
CCCTGCGCTGCTCCTTCTCCCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTG
GCAGCTGACAGACACCAAACAGCTGGTGACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCAGGGCAGC
GCCTATGCCAACCGCACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAATGCATCCCTGA
GGCTGCAGCGCGTGCGTGTGGCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGA
TTTCGGCAGCGCTGCCGTGAGCCTGCAGGTGGCCGCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACC
CTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTGACCATCACGTGCTCCAGCTACC
GGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGTGTGCCCCTGACTGGCAA
CGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCACAGCGTCCTGCGG
GTGGTGCTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTGCAGCAGG
ATGCGCACGGCTCTGTCACCATCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTGTG
GGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTCGTGTGC
TGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGG
AGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGA
TGGACAAGAAATAGCCTGA

Fig. 20-2

GAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGS
AYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMT
LEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLR
VVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVC
WRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSTALQPLKHSKEDDGQEIA

Fig. 21-1

atggaatggagttggatatttctctttctcctgtcaggaactgcaggtgtccactctgagg
 tccagctgcagcagctctggacctgagctggtaaagcctggggcttcagtgaagatgtcctg
 caaggcttctggatacacattcactaactatgttatgcactgggtgaagcagaagcctggg
 cagggccttgagtggattggatatattaatccttacaatgatgatgttaagtacaatgaga
 agttcaaaggcaaggccacacagacttcagacaaatcctccagcacagcctacatggagct
 cagcagcctgacctctgaggactctgcggtctattactgtgcaagatgggggtactacggt
 agtcccttatactactttgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcagcca
 aaacaacagcccatcggtctatccactggccctgtgtgtggagatacaactggctcctc
 ggtgactctaggatgcctgggtcaagggttatttccctgagccagtgccttgacctggaac
 tctggatccctgtccagtgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgacctctaca
 ccctcagcagctcagtgactgtaacctcgagcacctggcccagccagtcctcacctgcaa
 tgtggcccacccggcaagcagcaccaaggtggacaagaaaattgagcccagagggcccaca
 atcaagccctgtcctccatgcaaatgccagcacctaacctcttgggtggaccatccgtct
 tcatcttccctccaaagatcaaggatgtactcatgatctccctgagcccatagtccacatg
 tgtggtggtggatgtgagcgaggatgacctcagatgtccagatcagctggtttgtgaacaac
 gtggaagtacacacagctcagacacaaacctatagagaggattacaacagtactctccggg
 tggtcagtgccctccccatccagcaccaggactggatgagtggaaggagttcaaagtcaa
 ggtcaacaacaaagacctcccagcgcccatcgagagaacctctcaaaacccaaagggta
 gtaagagctccacaggtatatgtcttgctccaccagaagaagagatgactaagaacagg
 tctactctgacctgcatgggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaa
 caacgggaaaacagagctaaactacaagaacactgaaccagtcctggactctgatggttct
 tacttcatgtacagcaagctgagagtggaagaagaactgggtggaaagaaatagctact
 cctgttcagtgggtccacgaggggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccgga
 cccgggtaaa

Fig. 21-2

MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHWVKQKPG
 QGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQTS DKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYG
 SPLYYFDYWGQGTTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTN
 SGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPT
 IKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNN
 VEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWM SGEKFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGS
 VRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGS
 YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Fig. 22-1

atggattttctggtgcagattttcagcttcctgctaatacagtgcttcagtcataatgtcca
gaggacaaattgttctctcccagttctccaacaatcctgtctgcatctccaggggagaaggt
cacaatgacttgcagggccagctcaagactaatttacatgcattggtatcagcagaagcca
ggatcctcccccaaaccctggatttatgccacatccaacctggcttctggagtccttgctc
gcttcagtggtcagtggttctgggacctcttactctctcacaatcagcagagtggaggctga
agatgctgccacttattactgccagcagtggaatagtaacccacccacgttcggtactggg
accaagctggagctgaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatcca
gtgagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaa
agacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagt
tggaactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgacca
aggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttc
accatttgtcaagagcttcaacaggaatgagtgt

Fig. 22-2

MDFLVQIFSFLISASVIMSRGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSRLIYMHWYQQKP
GSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTG
TKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS
WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

Fig. 23

ggtaccacccaagctggctaggttaagcttgctagcgccaccatggtgctgcagacccaggt
gttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgatatcgtgatgattaaacgt
acggtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggca
ccgcctccgtggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaa
ggtggacaacgccctgcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaag
gacagcacctacagcctgagcagcacctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcaca
aggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagctcccccgtcaccaagagcttcaa
caggggggagtggttaggggcccgtttaaacgggtggcatccctgtgacccctccccagtg
ctctcctggccctggaagttgccactccagtgccaccagccttgctcctaataaaaattaa
ttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatgggggtggaggggggtggt
tggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaa
gctggagtgcagtgccacaatcttggctcactgcaatctccgcctcctgggttcaagcgat
tctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgaccagggtcacctaa
tttttggttttttggtagagacggggtttcaccatattggccaggctggtctccaactcct
aatctcaggtgatctaccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaaccac
tgctccacgcgcctgttagcgcgcatataagcgcgcggtgtggtggttacgcgcagcgt
gaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcccttctc
gccacgttcgcccgtttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggttccgat
ttagtgttttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgg
gccatcgccctgatagacggtttttcgccctttgacgttgagtcacggttctttaatagt
ggactcttggttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttgatttat
aagggttttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaa
cggaattaattctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtcgccaggctccccag
caggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtgtggaaagtcccc
aggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtc
ccgcccctaactccgcccataccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgcccc
atggctgactaattttttttatttatgcagaggccgaggccgctctgcctctgagctatt
ccagaagtagtgaggaggcttttttgagggcctaggcttttgcaaaaagctccccggg

Fig. 24

tgctagcgccaccatgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgg
gtgctgagccaggtgcaattgtgcaggcggtagctcagcctccaccaagggcccaagcgt
cttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgacctgggctgcctg
gtcaaggactacttccccgaacctcgtagcgtgagctggaactcaggcgacctgaccagcg
gcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggt
gacctgacctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccc
agcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaattctgtgacaaaactcacacatgcc
caccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttcctcttccccccaaaacc
caaggacacctcatgatctcccggaacctgaggtcacatgcgtggtgggtggacgtgagc
cacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcca
agacaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgt
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctc
ccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgt
acacctgcccccatcccgaggagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt
caaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagccccgagaac
aactacaagaccacctcccgctgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagc
tcacctgggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga
ggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctcccggaatgagatatc
gggcccgtttaaacgggtggca

Fig. 25-1

atgggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcc
aaattgttctctcccagctctccaacaatcctgtctgcacatctccaggggagaaggtcacat
gacttgcagggccagctcaagactaatttacatgcattggtatcagcagaagccaggatcc
tccccaaaccctggatttatgccacatccaacctggcttctggagtccttgcgttca
gtggcagtggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagagtggaggctgaagatgc
tgccacttattactgccagcagtggaatagtaaccacccacgttcggtactgggaccaag
ctggagctgaaacgtacggtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagc
agctgaagtcggtcaccgcctccgtggtgtgcctgctgaataacttctacccagagaggc
caaggtgcagtggaaggtggacaacgccttgcagtcgggaactcccaggagagcgtgacc
gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctgacctgagcaaagccg
actacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagctccccgt
caccaagagcttcaacaggggggagtg

Fig. 25-2

MVLQTQVFISLLWISGAYGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSRLIYMHWYQQKPGS
SPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGTK
LELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 26-1

atgaaacacctgtgggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgagg
 tccagctgcagcagctctggacctgagctggtaaagcctggggcttcagtgaagatgtcctg
 caaggcttctggatacacattcactaactatgttatgcactgggtgaagcagaagcctggg
 cagggccttgagtggattggatatattaatccttacaatgatgatgttaagtacaatgaga
 agttcaaaggcaaggccacacagacttcagacaaatcctccagcacagcctacatggaact
 cagcagcctgacctctgaggactctgcggtctattactgtgcaagatgggggtactacggt
 agtcccttatactactttgactactggggccaaggcaccactctcacagtacagctcagcct
 ccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcac
 agccgcccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccctgacccgtgagctggaac
 tcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctcaggactct
 actccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccacagacctacatctg
 caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgt
 gacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagctct
 tcctcttccccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatg
 cgtgggtgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
 gtggaggtgcataatgccaagacaaagccccgggaggagcagtaaacagcacgtaccggg
 tggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaa
 ggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccag
 ccccggaaccacaggtgtacacctgcccccatccccgggaggagatgaccaagaaccagg
 tcagcctgacctgcctgggtcaaaggettctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatggccagcccgagaacaactacaagaccacctcccgtgctggactccgacggctcc
 ttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttct
 catgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtc
 tccccgcaaa

Fig. 26-2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHWVKQKPG
 QGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYG
 SPLYFFDYWGQGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
 DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 27-1

atggtgctgcagacccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcg
agatcgtgctgacccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccct
gagctgcagagccagcagccgcctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccggccag
gccccagactgctgatctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatttt
ctggcagcggcagcggcaccgacttcacctgaccatctctcggtggaacccgaggactt
cgccgtgtactactgccagcagtggaaacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaag
gtcgaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcattctccccccctccgacgagc
agctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggc
caaggtgcagtggaaaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccaggagagcgtgacc
gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccg
actacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagctccccgt
caccaagagcttcaacaggggggagtg

Fig. 27-2

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQ
APRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 28-1

atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcg
agatcgtgctgaccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccct
gagctgcagagccagcagcaggctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccggccag
gccccagactgtggatctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatttt
ctggcagcggcagcggcaccgactacaccctgaccatcagccgcctggaacccgaggactt
cgccgtgtactactgccagcagtggaaacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaag
gtcgaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcattctccccccctccgacgagc
agctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggc
caaggtgcagtggaaaggtggacaacgccttcagtcgggaactcccaggagagcgtgacc
gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctgaccctgagcaaagccg
actacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccaccaggggcctgagctccccgt
caccaagagcttcaacaggggggagtg

Fig. 28-2

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQ
APRLWIYATSNLASGIPARFSGSGSDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 29-1

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcc
agatcgtgctgtcccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccct
gacctgcagagccagcagcaggctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccggcagc
gcccccaagctgtggatctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatttt
ctggcagcggcagcggcaccagctacaccctgaccatctcccgcttgaacccgaggactt
cgccgtgtactactgccagcagtggaaacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaag
gtcgaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagc
agctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggc
caaggtgcagtggaaaggtggacaacgccttgcagtcgggaactcccaggagagcgtgacc
gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccg
actacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccaggggctgagctccccgt
caccaagagcttcaacaggggggagtg

Fig. 29-2

MVLQTQVFISLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRASSRLIYMHWYQQKPGS
APKLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 30-1

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcg
agatcgtgctgacccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccct
gagctgcagagccagcagccgcctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccggccag
gccccagacctctgatctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatttt
ctggcagcggcagcggcaccgacttcaccctgaccatcagcagcctggaacccgaggactt
cgccgtgtactactgccagcagtggaaacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaag
gtcgaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagc
agctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggc
caaggtgcagtggaaaggtggacaacgccttcagtcgggaactcccaggagagcgtgacc
gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccg
actacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccaccagggcctgagctccccgt
caccaagagcttcaacaggggggagtgt

Fig. 30-2

MVLQTQVFISLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQ
APRPLIYATSNLASGIPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 31-1

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcc
agatcgtgctgtcccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccct
gacctgcagagccagcagcaggctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccggcagc
gcccccaagccttggatctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatttt
ctggcagcggcagcggcaccagctacaccctgaccatctcccgccctggaacccgaggactt
cgccgtgtactactgccagcagtggaaacagcaacccccccaccttcggccaggggcaccaag
gtcgaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagc
agctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggc
caaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccaggagagcgtgacc
gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccg
actacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagctccccgt
caccaagagcttcaacaggggggagtg

Fig. 31-2

MVLQTQVFISLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRASSRLIYMHWYQQKPGS
APKPWIYATSNLASGIPARFSGSGGTSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 32-1

atggtgctgcagacccaggtgttcattcctgctgctgtggatctccggcgcatatggcg
agatcgtgctgacccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccct
gagctgcagagccagcagccgcctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccggccag
gccccagacctctgatctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatttt
ctggcagcggcagcggcaccgacttcacctgaccatcagccgcctggaacccgaggactt
cgccgtgtactactgccagcagtggaaacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaag
gtcgaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcattccccccctccgacgagc
agctgaagtcggccaccgcctccgtgggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggc
caaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccaggagagcgtgacc
gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgacctgagcaaagccg
actacgagaagcacaaggtgtacgcctgagaggtgaccaccagggcctgagctccccgt
caccaagagcttcaacaggggggagtgt

Fig. 32-2

MVLQTQVFISLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQ
APRPLIYATSNLASGIPARFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 33-1

atggtgctgcagacccaggtgttcacatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcg
agatcgtgctgacccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccct
gagctgcagagccagcagccgcctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccggccag
gccccagacctctgatctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatttt
ctggcagcggcagcggcaccgactacaccctgaccatcagccgcctggaacccgaggactt
cgccgtgtactactgccagcagtggaaacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaag
gtcgaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcacatcttccccccctccgacgagc
agctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggc
caaggtgcagtggaaaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccaggagagcgtgacc
gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctgaccctgagcaaagccg
actacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagctccccgt
caccaagagcttcaacaggggggagtg

Fig. 33-2

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHYQQKPGQ
APRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 34-1

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagg
 tgcagctggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctg
 caaggccagcggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtgcgccaggccccctggg
 cagggactggaatggatgggctacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgaga
 agttcaagggcagagtgaccatcacccgcccagcagagcaccagcaccgcctacatggaact
 gagcagcctgcggagcagggacaccgcccgtgtactactgcgccagatggggctactacggc
 agccccctgtactacttcgactactggggccagggcaccctggtgacagtcagctcagcct
 ccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcgccac
 agccgcccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgaccgtgagctggaac
 tcaggcgcccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctcaggactct
 actccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctg
 caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgt
 gacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagctct
 tcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgacccttgaggtcacatg
 cgtgggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
 gtggaggtgcataatgccaagacaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccggg
 tggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaa
 ggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccag
 ccccggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagg
 tcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcc
 ttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaacgtcttct
 catgctccgtgatgcagtgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtc
 tccccgcaaa

Fig. 34-2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVRQAPG
 QGLEWMGYINPYNDDEVKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYG
 SPLYYFDYWQGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
 DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 35-1

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagg
 tgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctg
 caagggcagcggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtgcgccaggccccctggg
 cagggactggaatggatcggtacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgaga
 agttcaagggcagagtgaccatcacccgcccagagagcaccagcaccgcctacatggaact
 gagcagcctgcggagcagggacaccgcccgtgtactactgcgccagatggggctactacggc
 agccccctgtactacttcgactactggggccaggggcaccctggtgacagtcagctcagcct
 ccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcac
 agccgcccctgggtgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgaccgtgagctggaac
 tcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctcaggactct
 actccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctaactctg
 caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgt
 gacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtct
 tcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatg
 cgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
 gtggaggtgcataatgccaagacaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccggg
 tggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaa
 ggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccag
 ccccggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagg
 tcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcc
 ttcttcctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttct
 catgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtc
 tccccgcaaa

Fig. 35-2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVRQAPG
 QGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYG
 SPLYFFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 36-1

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgagg
 tgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctg
 caaggccagcggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtgaaacaggccccctggg
 cagggcctggaatggatcggctacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgaga
 agttcaagggaaggccaccatcacgcgcgacgagagcaccagcaccgcctacatggaact
 gagcagcctgcggagcgaggacaccgcctgtactactgcgccagatggggctactacggc
 agccccctgtactacttcgactactggggccagggcaccctggtgacagtcagctcagcct
 ccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcac
 agccgccttgggtgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgacccgtgagctggaac
 tcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctcaggactct
 actcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctg
 caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaattctgt
 gacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctgggggggaccctcagtct
 tcctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatg
 cgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
 gtggaggtgcataatgccaagacaaagccccgggaggagcagtaaacagcacgtaccggg
 tggtcagcgtcctcacctcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtcaa
 ggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccag
 ccccggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgaggaggagatgaccaagaaccagg
 tcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcc
 ttcttctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttct
 catgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtc
 tccccgcaaa

Fig. 36-2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVKQAPG
 QGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYG
 SPLYFFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
 DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

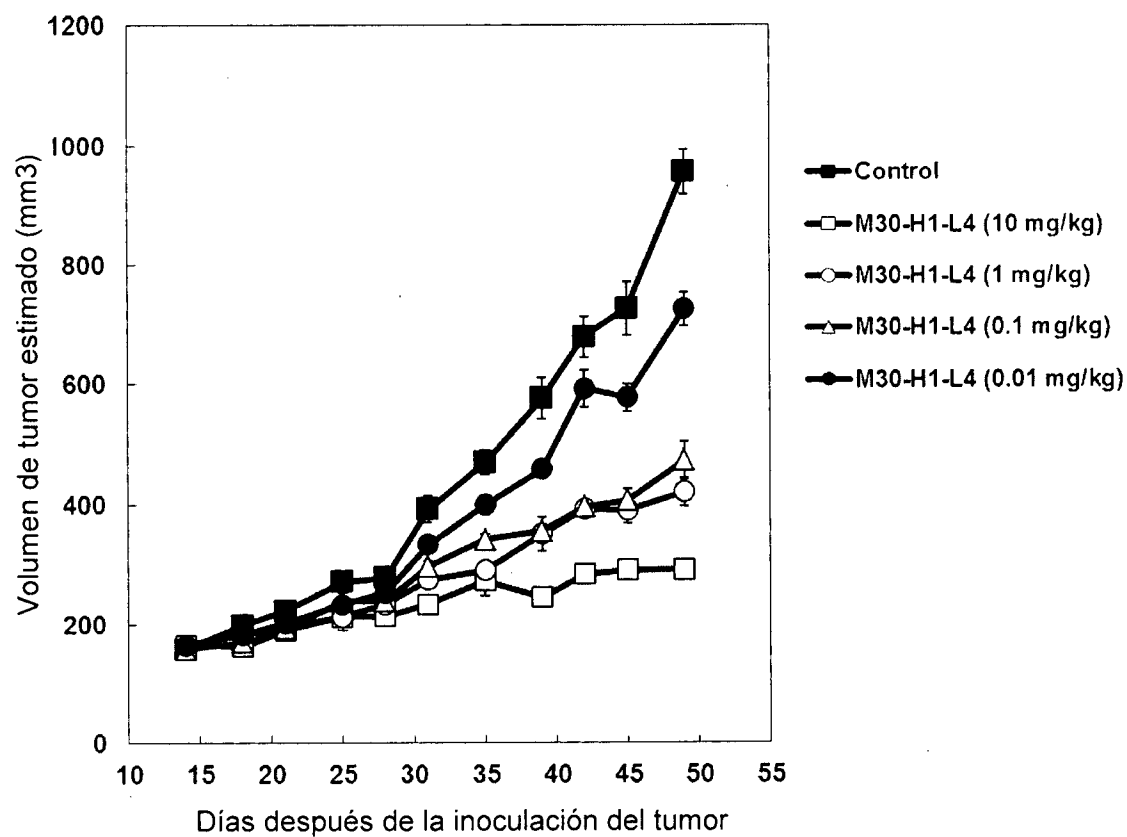
Fig. 37-1

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgagg
tgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctg
caaggccagcggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtcaagcaggccccctggg
cagggcctggaatggatcggctacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgaga
agttcaagggcaaggccaccagaccagcgacaagagcaccagcaccgcctacatggaact
gagcagcctgcggagcgaggacaccgcccgtgtactactgcgccagatggggctactacggc
agccccctgtactacttcgactactggggccagggcaccctggtcaccgtcagctcagcct
ccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcac
agccgcccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccctgaccgtgagctggaac
tcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctcaggactct
actccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctg
caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgt
gacaaaactcacacatgcccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagctct
tcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatg
cgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
gtggaggtgcataatgccaagacaaagccccgggaggagcagtaaacagcacgtaccggg
tggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaa
ggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccag
ccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagg
tcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
caatggccagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcc
ttcttcctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttct
catgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtc
tccccgcaaa

Fig. 37-2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVKQAPG
QGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQTSDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYG
SPLYYFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 38



LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Daiichi Sankyo Company Limited
 Takahashi, S.
 Matsuoka, T.
 Murakami, K.
 Takizawa, T.
 Hirotsu, K.
 Urano, A.
 10 Fukuchi, K.
 Yazawa, M.
 <120>anticuerpo Anti B7-H3
 15 <130> DAISAN-1-39233
 <150> PCT/JP12/060904
 <151> 2012-04-24
 20 <150> JP 2011-097645
 <151> 2011-04-25
 <150> US 61/478878
 <151> 2011-04-25
 25 <160> 97
 <170> PatentIn versión 3.4
 30 <210> 1
 <211> 46
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223>Cebador PCR
 <400> 1
 ctatagggag acccaagctg gctagcatgc tgcgtcggcg gggcag 46
 40
 <210> 2
 <211> 66
 <212>ADN
 45 <213>Secuencia Artificial
 <220>
 <223>Cebador PCR
 50 <400> 2
 aacggggccct ctgactcga gcggccgctc aggctatttc ttgtccatca tcttctttgc 60
 tgtcag 66
 55
 <210> 3
 <211> 21
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223>Cebador PCR
 <400> 3
 65 cgcaaatggg cggtaggcgt g 21

	<210> 4	
	<211> 18	
	<212>ADN	
	<213>Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223>Cebador PCR	
	<400> 4	
10	tagaaggcac agtcgagg	18
	<210> 5	
	<211> 1815	
15	<212>ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
20	atgctgctgc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca	60
	ctgtgggttct gcctcacagg agccctggag gtccagggtcc ctgaagaccc agtgggtggca	120
	ctgggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tctttctccc ctgagcctgg cttcagcctg	180
25	gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct	240
	gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg	300
	gcacagggca acgcatccct gaggtctgag cgcgtgctg tggcgacga gggcagcttc	360
30	acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccc tcagcctgca ggtggccgct	420
	ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg	480
35	gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat	540
	gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc	600
	ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc	660
40	ctgggtgcga accccgtgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag	720
	agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg	780
45	ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag	840
	ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc	900
	cgggaccagg gcagcgcta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacia	960
50	ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc	1020
	ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgtg gccgtcagcc tgcaggtggc cgtccctac	1080
	tcgaagccca gcatgacctt ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga caggtgacc	1140
55	atcacgtgct ccagctaccg gggctacctt gaggtgagg tgttctggca ggatgggcag	1200
	ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt	1260
60	gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg	1320
	cgcaaccccc tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg	1380
	acattcccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg	1440
65	ctgggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat	1500

gcaggagctg aggaccagga tggggagggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1560
aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cctgagcggc cgccactgtg 1620
5 ctggatatct gcagaattcc accacactgg actagtggat ccgagctcgg taccaagctt 1680
aagtttaaac cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg 1740
10 cccctcccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata 1800
aatgaggaa attgc 1815

<210> 6
15 <211> 534
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

20 Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15
25 Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30
Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45
30 Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60
Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80
35 Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95
Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
100 105 110
40 Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
115 120 125
45 Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
130 135 140
Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
145 150 155 160
50 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
165 170 175
Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
180 185 190
55 Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu
195 200 205
60 Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
210 215 220
Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln
225 230 235 240
65 Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val
245 250 255

Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
 260 265 270
 5 Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr
 275 280 285
 Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly
 290 295 300
 10 Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln
 305 310 315 320
 Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly
 325 330 335
 15 Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val
 340 345 350
 20 Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu
 355 360 365
 Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
 370 375 380
 25 Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
 385 390 395 400
 Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
 405 410 415
 Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
 420 425 430
 35 Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
 435 440 445
 Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
 450 455 460
 40 Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
 465 470 475 480
 Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
 485 490 495
 Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
 500 505 510
 50 Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
 515 520 525
 Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 530
 55
 <210> 7
 <211> 59
 <212>ADN
 60 <213>Secuencia Artificial
 <220>
 <223>Cebador PCR
 65 <400> 7
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatgctg cgtcggcggg gcagccctg

<210> 8
 <211> 43
 <212>ADN
 5 <213>Secuencia Artificial

 <220>
 <223>Cebador PCR

 10 <400> 8
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ggctatttct tgt 43

 <210> 9
 15 <211> 948
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 20 atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60
 ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccagggtcc ctgaagacct agtgggtggca 120
 ctgggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180
 25 gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctgggtgca cagctttgct 240
 gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300
 30 gcacagggca acgcatccct gaggtgctgag cgcgtgctg tggcggacga gggcagcttc 360
 acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccc tcagcctgca ggtggccgct 420
 ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480
 35 gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540
 gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
 40 ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc 660
 ctgggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag 720
 cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt 780
 45 gcaactgctgg tggccctggc tttcgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag 840
 gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag 900
 50 cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcc 948

 <210> 10
 <211> 316
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 60 Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
 20 25 30
 65 Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
 35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60
 5 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65 70 75 80
 Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95
 10 Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110
 15 Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
 115 120 125
 Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140
 20 Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175
 25 Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
 180 185 190
 30 Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
 195 200 205
 Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
 210 215 220
 35 Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
 225 230 235 240
 Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
 245 250 255
 40 Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
 260 265 270
 45 Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
 275 280 285
 Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
 290 295 300
 50 Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 305 310 315
 55 <210> 11
 <211> 52
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223>Cebador PCR
 <400> 11
 65 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cggagccctg gaggtccagg tc 52
 <210> 12

<211> 55
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

5 <220>
 <223>Cebador PCR

<400> 12
 10 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgctccctac tcgaagccca gcatg 55

<210> 13
 <211> 52
 <212>ADN
 15 <213>Secuencia Artificial

<220>
 <223>Cebador PCR

20 <400> 13
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cggagccgtg gaggtccagg tc 52

<210> 14
 25 <211> 55
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 30 <223>Cebador PCR

<400> 14
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgctccctac tcgaagccca gcatg 55

35 <210> 15
 <211> 54
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

40 <220>
 <223>Cebador PCR

<400> 15
 45 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcaggctatt tttgtccat catc 54

<210> 16
 <211> 43
 50 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 <223>Cebador PCR

55 <400> 16
 gggaatgtca taggctgccc ggccacctgc aggetgacgg cag 43

60 <210> 17
 <211> 42
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

65 <220>
 <223>Cebador PCR

<400> 17
gggaatgtca taggctgccc tgtggggcctt ctctgggggtg tg 42

5 <210> 18
<211> 43
<212>ADN
<213>Secuencia Artificial

10 <220>
<223>Cebador PCR

<400> 18
gggaatgtca taggctgccc ggccacctgc aggctgacgg cag 43

15

<210> 19
<211> 27
<212>ADN
20 <213>Secuencia Artificial

<220>
<223>Cebador PCR

25 <400> 19
gggcagccta tgacattccc cccagag 27
<210> 20
<211> 576
<212>ADN
30 <213> Homo sapiens

<400> 20
ggagccctgg aggtccaggt ccctgaagac ccagtgggtgg cactgggtggg caccgatgcc 60

35 accctgtgct gctccttctc ccctgagcct ggcttcagcc tggcacagct caacctcatc 120
tggcagctga cagataccaa acagctgggtg cacagctttg ctgagggcca ggaccagggc 180
agcgcttatg ccaaccgcac ggccctcttc ccggacctgc tggcacaggg caacgcatcc 240

40 ctgaggctgc agcgctgctg tgtggcggac gagggcagct tcacctgctt cgtgagcatc 300
cgggatttcg gcagcgctgc cgtcagcctg cagggtggccg ggcagcctat gacattcccc 360

45 ccagaggccc tgtgggtgac cgtggggctg tctgtctgtc tcattgcact gctgggtggcc 420
ctggctttcg tgtgctggag aaagatcaaa cagagctgtg aggaggagaa tgcaggagct 480
gaggaccagg atggggaggg agaaggctcc aagacagccc tgcagcctct gaaacactct 540

50 gacagcaaag aagatgatgg acaagaaata gcctga 576

<210> 21
55 <211> 191
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

60 Gly Ala Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val
1 5 10 15

Gly Thr Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe
65 20 25 30

Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln

	35		40		45	
	Leu Val His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala					
	50		55		60	
5	Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser					
	65		70		75	80
10	Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys					
		85		90		95
	Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val					
		100		105		110
15	Ala Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val					
		115		120		125
	Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val					
		130		135		140
20	Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala					
		145		150		155
				155		160
25	Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro					
		165		170		175
	Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala					
		180		185		190
30	<210> 22					
	<211> 552					
	<212>ADN					
	<213> Homo sapiens					
35	<400> 22					
	gctccctact cgaagcccag catgaccctg gagcccaaca aggacctgcg gccaggggac					60
	acggtgacca tcacgtgctc cagctaccag ggctaccctg aggctgaggt gttctggcag					120
40	gatgggcagg gtgtgcccct gactggcaac gtgaccacgt cgcagatggc caacgagcag					180
	ggcttgtttg atgtgcacag catcctgcgg gtggtgctgg gtgcaaatgg cacctacagc					240
45	tgcttggtgc gcaaccccgt gctgcagcag gatgcgcaca gctctgtcac catcacaccc					300
	cagagaagcc ccacagggca gcctatgaca ttccccccag aggccctgtg ggtgaccgtg					360
	gggctgtctg tctgtctcat tgcactgctg gtggccctgg ctttcgtgtg ctggagaaaag					420
50	atcaaacaga gctgtgagga ggagaatgca ggagctgagg accaggatgg ggagggagaa					480
	ggctccaaga cagccctgca gcctctgaaa cactctgaca gcaaagaaga tgatggacaa					540
55	gaaatagcct ga					552
	<210> 23					
	<211> 183					
60	<212> PRT					
	<213> Homo sapiens					
	<400> 23					
65	Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu					
	1		5		10	15

Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr
 20 25 30
 Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr
 35 40 45
 5 Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp
 50 55 60
 10 Val His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser
 65 70 75 80
 Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val
 85 90 95
 15 Thr Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro
 100 105 110
 Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala
 115 120 125
 20 Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser
 130 135 140
 25 Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu
 145 150 155 160
 Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu
 165 170 175
 30 Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 180
 35 <210> 24
 <211> 576
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 24
 ggagccgtgg aggtccaggt ccctgaggac ccggtggtgg ccctagtggg caccgatgcc 60
 accctgcgct gctccttctc ccccgagcct ggcttcagcc tggcacagct caacctcatc 120
 45 tggcagctga cagacaccaa acagctggtg cacagtttca ccgaaggccg ggaccagggc 180
 agcgcctatg ccaaccgcac ggccctcttc ccggacctgc tggcacaagg caatgcatcc 240
 ctgaggctgc agcgcgtgcg tgtggcggac gagggcagct tcacctgctt cgtgagcatc 300
 50 cgggatttcg gcagcgtgc cgtcagcctg caggtggccg ggcagcctat gacattcccc 360
 ccagaggccc tgtgggtgac cgtggggctg tctgtctgtc tcattgcact gctggtggcc 420
 55 ctggctttcg tgtgctggag aaagatcaaa cagagctgtg aggaggagaa tgcaggagct 480
 gaggaccagg atggggaggg agaaggctcc aagacagccc tgcagcctct gaaacactct 540
 gacagcaaag aagatgatgg acaagaaata gcctga 576
 60 <210> 25
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 25

	Gly	Ala	Val	Glu	Val	Gln	Val	Pro	Glu	Asp	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Val	
	1				5					10					15		
5	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Glu	Pro	Gly	Phe	
				20					25					30			
	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Asn	Leu	Ile	Trp	Gln	Leu	Thr	Asp	Thr	Lys	Gln	
			35					40					45				
10	Leu	Val	His	Ser	Phe	Thr	Glu	Gly	Arg	Asp	Gln	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ala	
		50					55					60					
	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Phe	Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	
	65					70					75					80	
15	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Cys	
					85					90					95		
	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp	Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Gln	Val	
20				100				105						110			
	Ala	Gly	Gln	Pro	Met	Thr	Phe	Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Thr	Val	
			115					120					125				
25	Gly	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Phe	Val	
		130					135					140					
	Cys	Trp	Arg	Lys	Ile	Lys	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Glu	Asn	Ala	Gly	Ala	
	145					150					155					160	
30	Glu	Asp	Gln	Asp	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Ser	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	
					165					170					175		
	Leu	Lys	His	Ser	Asp	Ser	Lys	Glu	Asp	Asp	Gly	Gln	Glu	Ile	Ala		
35				180					185					190			
	<210> 26																
	<211> 534																
40	<212>ADN																
	<213> Homo sapiens																
	<400> 26																
45	gctccctact cgaagcccag catgaccctg gagcccaaca aggacctgcg gccaggggac																60
	acggtgacca tcacgtgctc cagctaccgg ggctaccctg aggctgaggt gttctggcag																120
	gatgggcagg gtgtgcccct gactggcaac gtgaccacgt cgcagatggc caacgagcag																180
50	ggcttgtttg atgtgcacag cgtcctgcgg gtggtgctgg gtgcgaatgg cacctacagc																240
	tgcttggtgc gcaaccccggt gctgcagcag gatgcgcacg gctctgtcac catcacaggg																300
	cagcctatga cattcccccc agaggccctg tgggtgaccg tggggctgtc tgtctgtctc																360
55	attgcactgc tgggtggcct ggctttcgtg tgctggagaa agatcaaaca gagctgtgag																420
	gaggagaatg caggagctga ggaccaggat ggggaggag aaggctccaa gacagccctg																480
60	cagcctctga aacactctga cagcaaagaa gatgatggac aagaaatagc ctga																534
	<210> 27																
	<211> 177																
65	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																

<400> 27

5 Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu
 1 5 10 15
 Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr
 20 25 30
 10 Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr
 35 40 45
 Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp
 50 55 60
 15 Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser
 65 70 75 80
 Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val
 85 90 95
 20 Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val
 100 105 110
 Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala
 115 120 125
 Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala
 130 135 140
 30 Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile
 165 170 175
 Ala
 40 <210> 28
 <211> 1188
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 28
 gctccctact cgaagcccag catgaccctg gagcccaaca aggacctgcg gccaggggac 60
 acggtgacca tcacgtgctc cagctaccag ggctaccctg aggctgaggt gttctggcag 120
 50 gatgggcagg gtgtgccct gactggcaac gtgaccacgt cgcagatggc caacgagcag 180
 ggcttgtttg atgtgcacag catcctgcgg gtggtgctgg gtgcaaattg cacctacagc 240
 tgcttggtgc gcaaccccg gctgcagcag gatgcgcaca gctctgtcac catcacaccc 300
 55 cagagaagcc ccacaggagc cgtggaggtc cagggtccctg aggaccgggt ggtggcccta 360
 gtgggcaccg atgccaccct gcgctgctcc ttctcccccg agcctggctt cagcctggca 420
 60 cagctcaacc tcattctggca gctgacagac accaaacagc tgggtgcacag ttccaccgaa 480
 ggccgggacc agggcagcgc ctatgccaac cgcacggccc tcttccccga cctgctggca 540
 caaggcaatg catccctgag gctgcagcgc gtgcgtgtgg cggacgaggg cagcttcacc 600
 65 tgcttcgtga gcatccggga tttcggcagc gctgccgtca gcctgcaggt ggccgctccc 660

tactcgaagc ccagcatgac cctggagccc aacaaggacc tgcggccagg ggacacggtg 720
 accatcacgt gctccagcta ccggggctac cctgaggctg aggtgttctg gcaggatggg 780
 5 caggggtgtgc ccctgactgg caacgtgacc acgtcgcaga tggccaacga gcagggcttg 840
 tttgatgtgc acagcgtcct gcgggtggtg ctgggtgcga atggcaccta cagctgcctg 900
 gtgcgcaacc ccgtgctgca gcaggatgcg cacggctctg tcaccatcac agggcagcct 960
 10 atgacattcc ccccagaggc cctgtgggtg accgtggggc tgtctgtctg tctcattgca 1020
 ctgctggtgg ccctggcttt cgtgtgctgg agaaagatca aacagagctg tgaggaggag 1080
 15 aatgcaggag ctgaggacca ggatggggag ggagaaggct ccaagacagc cctgcagcct 1140
 ctgaaacact ctgacagcaa agaagatgat ggacaagaaa tagcctga 1188

20 <210> 29
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 29

Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu
 1 5 10 15

30 Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr
 20 25 30

Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr
 35 40 45

35 Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp
 50 55 60

Val His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser
 40 65 70 75 80

Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val
 85 90 95

45 Thr Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val
 100 105 110

Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125

50 Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu
 130 135 140

Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu
 55 145 150 155 160

Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro
 165 170 175

60 Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg
 180 185 190

Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe
 195 200 205

65 Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro
 210 215 220

	Ser	Met	Thr	Leu	Glu	Pro	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr	Val	
	225					230					235					240	
5	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val	Phe	
				245					250						255		
	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln	Gly	Val	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Thr	Ser	
				260					265					270			
10	Gln	Met	Ala	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	His	Ser	Val	Leu	Arg	
			275					280					285				
	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	
		290					295					300					
15	Val	Leu	Gln	Gln	Asp	Ala	His	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	
	305					310					315					320	
	Met	Thr	Phe	Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Gly	Leu	Ser	Val	
20					325					330					335		
	Cys	Leu	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Phe	Val	Cys	Trp	Arg	Lys	
				340					345					350			
25	Ile	Lys	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Glu	Asn	Ala	Gly	Ala	Glu	Asp	Gln	Asp	
			355					360					365				
	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Ser	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Lys	His	Ser	
		370					375					380					
30	Asp	Ser	Lys	Glu	Asp	Asp	Gly	Gln	Glu	Ile	Ala						
	385					390					395						
35	<210> 30																
	<211> 873																
	<212>ADN																
	<213> Homo sapiens																
40	<400> 30																
	ggagccgtgg	aggtccaggt	ccctgaggac	ccggtggtgg	ccctagtggg	caccgatgcc											60
	accctgcgct	gctccttctc	ccccgagcct	ggcttcagcc	tggcacagct	caacctcatc											120
45	tggcagctga	cagacaccaa	acagctggtg	cacagtttca	ccgaaggccg	ggaccagggc											180
	agcgcctatg	ccaaccgcac	ggccctcttc	ccggacctgc	tggcacaagg	caatgcatcc											240
	ctgaggctgc	agcgcgtgcg	tgtggcggac	gagggcagct	tcacctgctt	cgtgagcatc											300
50	cgggatttcg	gcagcgtgct	cgtcagcctg	caggtggccg	ctccctactc	gaagcccagc											360
	atgaccctgg	agcccaacaa	ggacctgcgg	ccagggggaca	cggtgaccat	cacgtgctcc											420
55	agctaccggg	gctaccctga	ggctgagggt	ttctggcagg	atgggcaggg	tgtgccctg											480
	actggcaacg	tgaccacgtc	gcagatggcc	aacgagcagg	gcttggttga	tgtgcacagc											540
	gtcctgcggg	tgggtgctgg	tgcgaatggc	acctacagct	gcctggtgcg	caaccccgtg											600
60	ctgcagcagg	atgcgcacgg	ctctgtcacc	atcacagggc	agcctatgac	attcccccca											660
	gaggccctgt	gggtgaccgt	ggggctgtct	gtctgtctca	ttgcactgct	ggtggccctg											720
65	gctttcgtgt	gctggagaaa	gatcaaacag	agctgtgagg	aggagaaatgc	aggagctgag											780
	gaccaggatg	gggagggaga	aggctccaag	acagccctgc	agcctctgaa	acactctgac											840

agcaaagaag atgatggaca agaaatagcc tga

873

5 <210> 31
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 31
 Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val
 1 5 10 15

15 Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe
 20 25 30
 Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln
 35 40 45

20 Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala
 50 55 60

25 Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys
 85 90 95

30 Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp
 115 120 125

35 Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly
 130 135 140

40 Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe
 165 170 175

45 Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser
 195 200 205

50 Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp
 210 215 220
 Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu
 225 230 235 240

55 Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn
 245 250 255

60 Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala
 260 265 270
 Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu
 275 280 285

65 Ile Ala
 290

<210> 32
 <211> 909
 <212>ADN
 5 <213> Homo sapiens

<400> 32
 atgcggctgg gcagtcctgg actgctcttc ctgctcttca gcagccttcg agctgatact 60
 10 caggagaagg aagtcagagc gatggtaggc agcgacgtgg agctcagctg cgcttgccct 120
 gaaggaagcc gttttgattt aaatgatgtt tacgtatatt ggcaaaccag tgagtcgaaa 180
 accgtggtga cctaccacat cccacagaac agctccttgg aaaacgtgga cagccgctac 240
 15 cggaaccgag ccctgatgtc accggccggc atgctgcggg gcgacttctc cctgcgcttg 300
 ttcaacgtca cccccagga cgagcagaag ttctactgcc tgggtgttgag ccaatccctg 360
 20 ggattccagg aggttttgag cgttgagggtt aactgcatg tggcagcaaa cttcagcgtg 420
 cccgtcgtca gcgcccccca cagcccctcc caggatgagc tcaccttcac gtgtacatcc 480
 ataaacggct accccaggcc caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg 540
 25 gaccaggctc tgcagaatga caccgtcttc ttgaacatgc ggggcttgta tgacgtggtc 600
 agcgtgctga ggatcgcacg gacccccagc gtgaacattg gctgctgcat agagaacgtg 660
 30 cttctgcagc agaacctgac tgtcggcagc cagacaggaa atgacatcgg agagagagac 720
 aagatcacag agaatccagt cagtaccggc gagaaaaacg cggccacgtg gagcatcctg 780
 gctgtcctgt gcctgcttgt ggtcgtggcg gtggccatag gctgggtgtg cagggaccga 840
 35 tgcctccaac acagctatgc aggtgcctgg gctgtgagtc cggagacaga gctcactggc 900
 cacgtttga 909

40
 <210> 33
 <211> 302
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu
 1 5 10 15
 50 Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp
 20 25 30
 Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn
 55 35 40 45
 Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr
 50 55 60
 60 Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr
 65 70 75 80
 Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe
 85 90 95
 65 Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His
 100 105 110

	Cys	Leu	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Leu	Gly	Phe	Gln	Glu	Val	Leu	Ser	Val	
		115						120					125				
5	Glu	Val	Thr	Leu	His	Val	Ala	Ala	Asn	Phe	Ser	Val	Pro	Val	Val	Ser	
		130					135					140					
	Ala	Pro	His	Ser	Pro	Ser	Gln	Asp	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Cys	Thr	Ser	
10		145				150				155						160	
	Ile	Asn	Gly	Tyr	Pro	Arg	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Ile	Asn	Lys	Thr	Asp	
					165				170						175		
	Asn	Ser	Leu	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Asp	Thr	Val	Phe	Leu	Asn	
15				180					185					190			
	Met	Arg	Gly	Leu	Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Val	Leu	Arg	Ile	Ala	Arg	Thr	
			195					200						205			
20	Pro	Ser	Val	Asn	Ile	Gly	Cys	Cys	Ile	Glu	Asn	Val	Leu	Leu	Gln	Gln	
		210					215					220					
	Asn	Leu	Thr	Val	Gly	Ser	Gln	Thr	Gly	Asn	Asp	Ile	Gly	Glu	Arg	Asp	
25		225				230					235					240	
	Lys	Ile	Thr	Glu	Asn	Pro	Val	Ser	Thr	Gly	Glu	Lys	Asn	Ala	Ala	Thr	
					245					250					255		
	Trp	Ser	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Val	Val	Val	Ala	Val	Ala	
30				260					265					270			
	Ile	Gly	Trp	Val	Cys	Arg	Asp	Arg	Cys	Leu	Gln	His	Ser	Tyr	Ala	Gly	
			275					280					285				
35	Ala	Trp	Ala	Val	Ser	Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Thr	Gly	His	Val			
		290					295					300					
	<210>	34															
40	<211>	873															
	<212>	ADN															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	34															
45	atgaggatat	ttgctgtctt	tatattcatg	acctactggc	atttgctgaa	cgcatttact										60	
	gtcacggttc	ccaaggacct	atatgtggta	gagtatggta	gcaatatgac	aattgaatgc										120	
50	aaattcccag	tagaaaaaca	attagacctg	gctgcactaa	ttgtctattg	ggaaatggag										180	
	gataagaaca	ttattcaatt	tgtgcatgga	gaggaagacc	tgaaggttca	gcatagtagc										240	
	tacagacaga	gggcccggt	gttgaaggac	cagctctccc	tgggaaatgc	tgcaacttcag										300	
55	atcacagatg	tgaaattgca	ggatgcaggg	gtgtaccgct	gcatgatcag	ctatggtggt										360	
	gccgactaca	agcgaattac	tgtgaaagtc	aatgccccat	acaacaaaat	caaccaaaaga										420	
60	attttggttg	tggatccagt	cacctctgaa	catgaactga	catgtcaggc	tgagggctac										480	
	cccaaggccg	aagtcactctg	gacaagcagt	gaccatcaag	tcctgagtgg	taagaccacc										540	
	accaccaatt	ccaagagaga	ggagaagctt	ttcaatgtga	ccagcacact	gagaatcaac										600	
65	acaacaacta	atgagatttt	ctactgcact	ttaggagat	tagatcctga	ggaaaaccat										660	

	acagctgaat	tggtcatccc	agaactacct	ctggcacatc	ctccaaatga	aaggactcac	720
	ttggtaattc	tgggagccat	cttattatgc	cttggtgtag	cactgacatt	catcttccgt	780
5	ttaagaaaag	ggagaatgat	ggatgtgaaa	aaatgtggca	tccaagatac	aaactcaaag	840
	aagcaaagtg	atacacattt	ggaggagacg	taa			873
10	<210>	35					
	<211>	290					
	<212>	PRT					
	<213>	Homo sapiens					
15	<400>	35					
	Met	Arg	Ile	Phe	Ala	Val	Phe
	1			5			10
							15
20	Asn	Ala	Phe	Thr	Val	Thr	Val
			20			25	30
	Gly	Ser	Asn	Met	Thr	Ile	Glu
			35			40	45
25	Asp	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Val
		50				55	60
	Ile	Gln	Phe	Val	His	Gly	Glu
30		65				70	75
							80
	Tyr	Arg	Gln	Arg	Ala	Arg	Leu
				85			90
							95
35	Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr	Asp
			100				105
							110
	Arg	Cys	Met	Ile	Ser	Tyr	Gly
			115				120
40							125
	Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn
		130					135
							140
	Asp	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	His
45		145				150	
							155
	Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Trp
				165			170
							175
50	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn
			180				185
							190
	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile
			195				200
							205
55	Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp
		210					215
							220
	Val	Ile	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu
60		225				230	
							235
	Leu	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	Ile
				245			250
							255
65	Phe	Ile	Phe	Arg	Leu	Arg	Lys
			260				265
							270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285

5 Glu Thr
 290

<210> 36
 10 <211> 909
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 15 atgcggctgg gcagtcctgg actgctcttc ctgctcttca gcagccttcg agctgatact 60
 caggagaagg aagtcagagc gatggtaggc agcgacgtgg agctcagctg cgcttgccct 120
 20 gaaggaagcc gttttgattt aaatgatgtt tacgtatatt ggcaaaccag tgagtcgaaa 180
 accgtggtga cctaccacat cccacagaac agctccttgg aaaacgtgga cagccgctac 240
 cggaaccgag ccctgatgtc accggccggc atgctgcggg gcgacttctc cctgcgcttg 300
 25 ttcaacgtca cccccagga cgagcagaag tttcactgcc tgggtgttgag ccaatccctg 360
 ggattccagg aggttttgag cgttgagggtt aactgcatg tggcagcaaa cttcagcgtg 420
 cccgtcgtca gcgcccccca cagcccctcc caggatgagc tcaccttcac gtgtacatcc 480
 30 ataaacggct accccaggcc caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg 540
 gaccaggctc tgcagaatga caccgtcttc ttgaacatgc ggggcttgta tgacgtggtc 600
 35 agcgtgctga ggatcgacg gacccccagc gtgaacattg gctgctgcat agagaacgtg 660
 cttctgcagc agaacctgac tgtcggcagc cagacaggaa atgacatcgg agagagagac 720
 aagatcacag agaatccagt cagtaccggc gagaaaaacg cggccacgtg gagcatcctg 780
 40 gctgtcctgt gcctgcttgt ggtcgtggcg gtggccatag gctgggtgtg cagggaccga 840
 tgccccaac acagctatgc aggtgcctgg gctgtgagtc cggagacaga gctcactggc 900
 45 cacgtttga 909

<210> 37
 <211> 302
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

55 Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu
 1 5 10 15

Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp
 20 25 30

60 Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn
 35 40 45

Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr
 50 55 60

65 Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr
 65 70 75 80

	Arg	Asn	Arg	Ala	Leu	Met	Ser	Pro	Ala	Gly	Met	Leu	Arg	Gly	Asp	Phe	
					85					90					95		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Pro	Gln	Asp	Glu	Gln	Lys	Phe	His	
				100					105					110			
	Cys	Leu	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Leu	Gly	Phe	Gln	Glu	Val	Leu	Ser	Val	
			115					120					125				
10	Glu	Val	Thr	Leu	His	Val	Ala	Ala	Asn	Phe	Ser	Val	Pro	Val	Val	Ser	
		130					135					140					
15	Ala	Pro	His	Ser	Pro	Ser	Gln	Asp	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Cys	Thr	Ser	
	145					150					155					160	
	Ile	Asn	Gly	Tyr	Pro	Arg	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Ile	Asn	Lys	Thr	Asp	
					165					170					175		
20	Asn	Ser	Leu	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Asp	Thr	Val	Phe	Leu	Asn	
				180					185					190			
	Met	Arg	Gly	Leu	Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Val	Leu	Arg	Ile	Ala	Arg	Thr	
			195					200					205				
25	Pro	Ser	Val	Asn	Ile	Gly	Cys	Cys	Ile	Glu	Asn	Val	Leu	Leu	Gln	Gln	
		210					215					220					
30	Asn	Leu	Thr	Val	Gly	Ser	Gln	Thr	Gly	Asn	Asp	Ile	Gly	Glu	Arg	Asp	
	225					230					235					240	
	Lys	Ile	Thr	Glu	Asn	Pro	Val	Ser	Thr	Gly	Glu	Lys	Asn	Ala	Ala	Thr	
					245					250					255		
35	Trp	Ser	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Val	Val	Val	Ala	Val	Ala	
				260					265					270			
	Ile	Gly	Trp	Val	Cys	Arg	Asp	Arg	Cys	Leu	Gln	His	Ser	Tyr	Ala	Gly	
		275						280					285				
40	Ala	Trp	Ala	Val	Ser	Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Thr	Gly	His	Val			
		290					295					300					
45	<210> 38																
	<211> 867																
	<212>ADN																
	<213> Homo sapiens																
50	<400> 38																
	atgggccaca	cacggaggca	gggaacatca	ccatccaagt	gtccatacct	caatttcttt											60
	cagctcttgg	tgctggctgg	tctttctcac	ttctgttcag	gtgttatcca	cgtgaccaag											120
55	gaagtgaaag	aagtggcaac	gctgtcctgt	ggtcacaatg	tttctgttga	agagctggca											180
	caaactcgca	tctactggca	aaaggagaag	aaaatggtgc	tgactatgat	gtctggggac											240
	atgaatatat	ggcccagagta	caagaaccgg	accatctttg	atatcactaa	taacctctcc											300
60	attgtgatcc	tggctctgcg	cccatctgac	gagggcacat	acgagtgtgt	tgttctgaag											360
	tatgaaaaag	acgctttcaa	gcgggaacac	ctggctgaag	tgacgttatc	agtcaaagct											420
65	gacttcoccta	cacctagtat	atctgacttt	gaaattccaa	cttctaatat	tagaaggata											480
	atttgctcaa	cctctggagg	ttttccagag	cctcacctct	cctggttgga	aaatggagaa											540

gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
 5 agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
 ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720
 gataacctgc tcccacctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat tttgtgata 780
 10 tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
 agaagggaaa gtgtacgcc tgtatag 867

15 <210> 39
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 39

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
 1 5 10 15
 25 Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20 25 30
 Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
 35 40 45
 30 Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
 50 55 60
 Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
 65 70 75 80
 35 Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
 85 90 95
 Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
 40 100 105 110
 Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
 115 120 125
 45 Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
 130 135 140
 Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
 145 150 155 160
 50 Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
 165 170 175
 Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
 180 185 190
 55 Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
 195 200 205
 60 Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
 210 215 220
 Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
 225 230 235 240
 65 Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
 245 250 255

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
260 265 270

5 Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
275 280 285

<210> 40
10 <211> 990
<212>ADN
<213> Homo sapiens

<400> 40
15 atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctgggtgctg ctctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
20 gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga cctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggtt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
25 attcgcatcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
30 cacggttacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
35 gaaactgaca agacgaggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctccccag accacattcc ttggattaca gctgtacttc caacagttat tatatgtgtg 780
40 atggttttct gtctaattct atggaaatgg aagaagaaga agcggcctcg caactcttat 840
aaatgtggaa ccaacacaat ggagagggaa gagagtgaac agaccaagaa aagagaaaaa 900
atccatatac ctgaaagatc tgatgaagcc cagcgtgttt ttaaaagttc gaagacatct 960
45 tcatgcgaca aaagtgatac atgtttttag 990

<210> 41
50 <211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
55 Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
1 5 10 15
60 Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
20 25 30
Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
35 40 45
65 Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
50 55 60

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
 65 70 75 80
 5 Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 85 90 95
 Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
 100 105 110
 10 His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
 115 120 125
 Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
 130 135 140
 15 Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
 145 150 155 160
 His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
 165 170 175
 20 Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
 180 185 190
 25 Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
 195 200 205
 Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
 210 215 220
 30 Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
 225 230 235 240
 Pro Pro Pro Asp His Ile Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val
 245 250 255
 35 Ile Ile Cys Val Met Val Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys
 260 265 270
 40 Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu
 275 280 285
 Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro
 290 295 300
 45 Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser
 305 310 315 320
 Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr Cys Phe
 325
 50
 <210> 42
 <211> 849
 <212>ADN
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 atggcttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct 60
 60 ggagcaattg cactcatcat tggctttggg atttcaggga gacactccat cacagtcact 120
 actgtcgcct cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct 180
 gacatcaaac tttctgatat cgtgatacaa tggctgaagg aaggtgtttt aggcttggtc 240
 65 catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tcggagcagg atgaaatgtt cagaggccgg 300
 acagcagtgt ttgctgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggct gaaaaacgtg 360

	caactcacag atgctggcac ctacaaatgt tatatcatca cttctaaagg caaggggaat	420
	gctaaccttg agtataaaac tggagccttc agcatgccgg aagtgaatgt ggactataat	480
5	gccagctcag agaccttgcg gtgtgaggct ccccgatggg tccccagcc cacagtgggc	540
	tgggcatccc aagttgacca gggagccaac ttctcggaag tctccaatac cagctttgag	600
10	ctgaactctg agaatgtgac catgaagggt gtgtctgtgc tctacaatgt tacgatcaac	660
	aacacatact cctgtatgat tgaatatgac attgccaaag caacagggga tatcaaagt	720
	acagaatcgg agatcaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaaa ggcttctctg	780
15	tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg	840
	ctaaaatag	849
20	<210> 43	
	<211> 282	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 43	
	Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile	
30	1 5 10 15	
	Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser	
	20 25 30	
	Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile	
35	35 40 45	
	Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu	
	50 55 60	
40	Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val	
	65 70 75 80	
	His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met	
45	85 90 95	
	Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn	
	100 105 110	
	Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr	
50	115 120 125	
	Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu	
	130 135 140	
55	Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn	
	145 150 155 160	
	Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln	
60	165 170 175	
	Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser	
	180 185 190	
	Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met	
65	195 200 205	
	Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser	

	210	215	220	
	Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val			
	225	230	235	240
5	Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser			
		245	250	255
10	Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu			
		260	265	270
	Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys			
		275	280	
15	<210> 44 <211> 10 <212> PRT <213> Mus musculus			
20	<400> 44 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu 1 5 10			
25	<210> 45 <211> 14 <212> PRT <213> Mus musculus			
30	<400> 45 Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser Ala Ser Pro 1 5 10			
35	<210> 46 <211> 26 <212>ADN <213>Secuencia Artificial			
40	<220> <223>Cebador PCR			
45	<400> 46 aagaattcat ggaatggagt tggata			
	26			
50	<210> 47 <211> 32 <212>ADN <213>Secuencia Artificial			
55	<220> <223>Cebador PCR			
60	<400> 47 aagatatctc atttaccgg agtccgggag aa			
	32			
65	<210> 48 <211> 26 <212>ADN <213>Secuencia Artificial			
	<220>			

	<223>Cebador PCR	
	<400> 48	
5	aagaattcat ggattttctg gtgcag	26
	<210> 49	
	<211> 32	
	<212>ADN	
10	<213>Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223>Cebador PCR	
15	<400> 49	
	aagatatctt aacactcatt cctggtgaag ct	32
	<210> 50	
20	<211> 1413	
	<212>ADN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 50	
25	atggaatgga gttggatatt tctctttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccaactctgag	60
	gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gtaaagcctg gggcttcagt gaagatgtcc	120
	tgcaaggctt ctggatacac attcactaac tatgttatgc actgggtgaa gcagaagcct	180
30	gggcagggcc ttgagtggat tggatatatt aatccttaca atgatgatgt taagtacaat	240
	gagaagttca aaggcaaggc cacacagact tcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
35	gagctcagca gcctgacctc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atgggggtac	360
	tacggtagtc cttatacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc	420
	tcagccaaaa caacagcccc atcgggtctat ccactggccc ctgtgtgtgg agatacaact	480
40	ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg	540
	acctggaact ctggatccct gtccagtggg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct	600
45	gacctctaca ccctcagcag ctcagtgact gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc	660
	atcacctgca atgtggcca cccggcaagc agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc	720
	agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt	780
50	ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc	840
	cccatagtca catgtgtggg ggtggatgtg agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc	900
55	tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca gtcagacac aaacccatag agaggattac	960
	aacagtactc tccgggtggg cagtgccctc cccatccagc accaggactg gatgagtggc	1020
	aaggagttca aatgcaaggt caacaacaaa gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc	1080
60	tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca caggtatatg tcttgcctcc accagaagaa	1140
	gagatgacta agaaacaggt cactctgacc tgcattgtca cagacttcat gcctgaagac	1200
65	atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa acagagctaa actacaagaa cactgaacca	1260
	gtcctggact ctgatggttc ttacttcatg tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac	1320

tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca gtgggtccacg aggggtctgca caatcaccac 1380
 acgactaaga gcttctcccg gactccgggt aaa 1413
 5
 <210> 51
 <211> 471
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 51
 15 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 25 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 30 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 130 135 140
 40 Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 45 Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
 195 200 205
 Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn
 210 215 220
 55 Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro
 225 230 235 240
 Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 60 Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
 260 265 270
 Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 65 Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn

	290		295		300	
	Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr					
	305		310		315	320
5						
	Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp					
		325		330		335
10	Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu					
		340		345		350
	Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg					
		355		360		365
15	Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys					
		370		375		380
	Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp					
20	385		390		395	400
	Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys					
		405		410		415
25	Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser					
		420		425		430
	Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser					
		435		440		445
30	Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser					
		450		455		460
	Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys					
35	465		470			
	<210> 52					
	<211> 705					
40	<212>ADN					
	<213> Mus musculus					
	<400> 52					
45	atggattttc tgggtcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc					60
	agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca acaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag					120
	gtcacaatga cttgcagggc cagctcaaga ctaatttaca tgcattggta tcagcagaag					180
50	ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcctt					240
	gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag					300
55	gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggaata gtaaccacc caggttcggt					360
	actgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca					420
	ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc					480
60	taccccaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc					540
	ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc					600
	acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggg cactcacaag					660
65	acatcaactt caccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgt					705

<210> 53
<211> 235
<212> PRT
5 <213> Mus musculus

<400> 53

10 Met Asp Phe Leu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile
20 25 30

15 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Arg Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
20 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

25 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

30 Asn Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140
35 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
40 165 170 175

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

45 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
195 200 205

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
210 215 220
50 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

55 <210> 54
<211> 28
<212>ADN
<213>Secuencia Artificial

<220>
60 <223>Cebador PCR

<400> 54
ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagc

65 <210> 55
<211> 30

<212>ADN

<213>Secuencia Artificial

<220>

5 <223>Cebador PCR

<400> 55

aaacccggga gctttttgca aaagcctagg

30

10

<210> 56

<211> 1704

<212>ADN

<213>Secuencia Artificial

15

<220>

<223>señal de secreción de cadena kappa humana, región constante de cadena kappa humana y señal adicional de poli-A humana

<400> 56

20 ggtaccaccc aagctggcta ggtaagcttg ctacgcgccac catggtgctg cagacccagg 60

tggtcatctc cctgctgctg tggatctccg gcgcataatgg cgatatcgtg atgattaaac 120

25

gtacgggtggc cgccccctcc gtgttcatct tccccccctc cgacgagcag ctgaagtccg 180

gcaccgcctc cgtgggtgtgc ctgctgaata acttctaccc cagagaggcc aaggtgcagt 240

ggaaggtgga caacgccctg cagtccggga actcccagga gagcgtgacc gagcaggaca 300

30

gcaaggacag cacctacagc ctgagcagca ccctgaccct gagcaaagcc gactacgaga 360

agcacaaggt gtacgcctgc gaggtgaccc accagggcct gagctcccc gtcaccaaga 420

35

gcttcaacag gggggagtgt taggggccc tttaaacggg tggcatccct gtgaccctc 480

cccagtgctc ctctggccc tggaagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaata 540

aaaattaagt tgcattcattt tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tgggggtggag 600

40

gggggtggtg tggagcaagg ggcaagttgg gaagacaacc tgtagggcct gcgggggtcta 660

ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc actgcaatct ccgcctcctg 720

45

ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc cgagttgttg ggattccagg catgcatgac 780

caggctcacc taatttttgt ttttttggtg gagacggggg ttcaccatat tggccaggct 840

ggtctccaac tcctaattctc aggtgatcta cccaccttgg cctcccaaat tgctgggatt 900

50

acaggcgtga accactgctc cacgcgccct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg 960

tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcggccgct cctttcgctt 1020

55

tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc 1080

tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctoga ccccaaaaaa cttgattagg 1140

gtgatgggtc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg 1200

60

agtccacgtt ctttaatatg ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct 1260

cggtctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg 1320

agctgattta acaaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc agttaggggtg 1380

65

tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc 1440

agcaaccagg tgtggaaagt cccagggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca 1500
 tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc 1560
 5 gccaggttcc gccattctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagagggc 1620
 cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct 1680
 10 aggcttttgc aaaaagctcc cggg 1704

 <210> 57
 <211> 1120
 <212>ADN
 15 <213>Secuencia Artificial

 <220>
 <223>secuencia de señal y región constante de IgG1 humana
 <400> 57
 20 tgctagcgcc accatgaaac acctgtggtt ctctctcctg ctggtggcag ctcccagatg 60
 ggtgctgagc caggtgcaat tgtgcaggcg gttagctcag cctccaccaa gggcccaagc 120
 25 gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctggcg gcacagccgc cctgggctgc 180
 ctggtcaagg actacttccc cgaaccctg accgtgagct ggaactcagg cgccctgacc 240
 agcggcgtgc acaccttccc cgctgtcctg cagtctcag gactctactc cctcagcagc 300
 30 gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 360
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 420
 acatgcccac cctgcccagc acctgaactc ctgggggggac cctcagtctt cctcttcccc 480
 35 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 540
 gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaag ttcaactgg acgtggacgg cgtggagggtg 600
 40 cataatgcca agacaaagcc ccgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 660
 gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720
 45 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg ccagccccgg 780
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 900
 50 ggccagcccg agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcagggcaa cgtcttctca 1020
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacaccc agaagagcct ctccctgtct 1080
 55 cccggcaaat gagatatcg gcccgtttaa acgggtggca 1120

 <210> 58
 60 <211> 699
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223>Cadena ligera de quimérico M30

 <400> 58

	atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc	60
	caaattgttc tctcccagtc tccaacaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca	120
5	atgacttgca gggccagctc aagactaatt tacatgcatt ggtatcagca gaagccagga	180
	tcctccccca aacctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc	240
10	ttcagtggca gtgggtctgg gacctttac tctctcaca tcagcagagt ggaggctgaa	300
	gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg aatagtaacc caccacgtt cggtactggg	360
	accaagctgg agctgaaacg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc	420
15	gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtgggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc	480
	agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag	540
	agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg	600
20	agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg	660
	agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt	699
25	<210> 59 <211> 233 <212> PRT <213>Secuencia Artificial	
30	<220> <223>Cadena ligera de quimérico M30 <400> 59	
35	Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
	1 5 10 15	
	Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser	
	20 25 30	
40	Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg	
	35 40 45	
45	Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys	
	50 55 60	
	Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg	
	65 70 75 80	
50	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg	
	85 90 95	
	Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser	
	100 105 110	
55	Asn Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr	
	115 120 125	
60	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu	
	130 135 140	
	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro	
	145 150 155 160	
65	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly	
	165 170 175	

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

5 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

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

10 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

15 <210> 60
 <211> 42
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

20 <220>
 <223>Cebador PCR

25 <400> 60
 aaacatatgg ccaaattggt ctctcccagt ctccaacaat cc 42

30 <210> 61
 <211> 37
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

35 <220>
 <223>Cebador PCR

40 <400> 61
 aaacgtacgt ttcagctcca gcttggtccc agtaccg 37

45 <210> 62
 <211> 1413
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

50 <220>
 <223>Cadena pesada de quimérico M30

55 <400> 62
 atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60
 gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gtaaagcctg gggcttcagt gaagatgtcc 120
 tgcaaggctt ctggatacac attcactaac tatgttatgc actgggtgaa gcagaagcct 180
 gggcagggcc ttgagtggat tggatatatt aatccttaca atgatgatgt taagtacaat 240
 gagaagttca aaggcaaggc cacacagact tcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 gaactcagca gcctgacctc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atgggggtac 360
 tacggtagtc cttatacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtcagc 420
 tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
 65 ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540
 agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660
 5 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780
 ggaccctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 840
 10 cctgaggtca catgctggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccccggga ggagcagtag 960
 aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
 15 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatoga gaaaaccatc 1080
 tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgagg 1140
 20 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tccagcgac 1200
 atcgccgtgg agtgggagag caatggccag ccgagaaca actacaagac caccctccc 1260
 25 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 1380
 acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413
 30
 <210> 63
 <211> 471
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223>Cadena pesada de quimérico M30
 <400> 63
 40 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 45 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 50 Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 55 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 60 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115 120 125
 65 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	145	150	155	160
5	Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		165	170	175
	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		180	185	190
10	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		195	200	205
	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		210	215	220
15	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu		225	230	235
	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		245	250	255
	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		260	265	270
25	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		275	280	285
	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		290	295	300
30					
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		305	310	315
35	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		325	330	335
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		340	345	350
40					
	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		355	360	365
45	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		370	375	380
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		385	390	395
50	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		405	410	415
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		420	425	430
55					
	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		435	440	445
60	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		450	455	460
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		465	470	
65					
	<210> 64				

<211> 40
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223>Cebador PCR
 <400> 64
 aaagctgagc gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag 40
 10
 <210> 65
 <211> 36
 <212>ADN
 15 <213>Secuencia Artificial
 <220>
 <223>Cebador PCR
 20 <400> 65
 gaggtcaggc tgctgagttc catgtaggct gtgctg 36
 <210> 66
 25 <211> 36
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223>Cebador PCR
 <400> 66
 cagcacagcc tacatggaac tcagcagcct gacctc 36
 35
 <210> 67
 <211> 39
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223>Cebador PCR
 <400> 67
 45 aaagctgagc tgactgtgag agtgggtgcct tggccccag 39
 <210> 68
 <211> 40
 50 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 <220>
 <223>Cebador PCR
 55
 <400> 68
 aaagctgagc gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag 40
 60
 <210> 69
 <211> 39
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 65
 <220>
 <223>Cebador PCR

<400> 69
aaagctgagc tgactgtgag agtgggtgcct tggccccag 39

5 <210> 70
<211> 699
<212>ADN
<213>Secuencia Artificial
<220>
10 <223>Cadena ligera humanizada de M30

<400> 70
atgggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc 60

15 gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120
ctgagctgca gagccagcag ccgcctgac tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180
caggccccca gactgctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240

20 ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tctctcggct ggaacccgag 300
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc 360

25 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc 420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540

30 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggcg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660

35 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 71
<211> 233
40 <212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>Cadena ligera humanizada de M30

45 <400> 71

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

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

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

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

60 Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

65 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser

	100	105	110
	Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		
	115	120	125
5	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu		
	130	135	140
10	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro		
	145	150	155 160
	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly		
		165	170 175
15	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr		
		180	185 190
	Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His		
		195	200 205
20	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
		210	215 220
25	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	225	230	
	<210> 72		
	<211> 699		
30	<212>ADN		
	<213>Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223>Cadena ligera humanizada de M30		
35	<400> 72		
	atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc		60
	gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc		120
40	ctgagctgca gagccagcag caggctgac tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc		180
	caggccccca gactgtggat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga		240
45	ttttctggca gcggcagcgg caccgactac accctgacca tcagccgcct ggaacccgag		300
	gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc ccccccactt cggccagggc		360
	accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc		420
50	gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc		480
	agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag		540
	agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg		600
55	agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg		660
	agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt		699
60	<210> 73		
	<211> 233		
	<212> PRT		
	<213>Secuencia Artificial		
65	<220>		
	<223>Cadena ligera humanizada de M30		

<400> 73

5 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 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30
10 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45
Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60
15 Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80
20 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110
25 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140
30 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160
35 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190
40 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220
45 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

50 <210> 74
<211> 699
<212>ADN
<213>Secuencia Artificial

55 <220>
<223>Cadena ligera humanizada de M30

<400> 74
60 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc 60
cagatcgtgc tgtcccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120
ctgacctgca gagccagcag caggctgac tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180
65 agcgccccca agctgtggat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240
ttttctggca gcggcagcgg caccagctac accctgacca tctcccgcct ggaacccgag 300

gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc ccccccacctt cggccagggc 360
5 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcattctt cccccctcc 420
gacgagcagc tgaagtcccg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccttgc agtcgggaa ctcccaggag 540
10 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660
15 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 75
<211> 233
<212> PRT
20 <213>Secuencia Artificial

<220>
<223>Cadena ligera humanizada de M30

25 <400> 75

30 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15
Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30
35 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45
Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
50 55 60
40 Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95
45 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110
50 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140
55 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175
60 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190
65 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

	210	215	220
	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
5	225	230	
	<210> 76		
	<211> 699		
	<212>ADN		
10	<213>Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223>Cadena ligera humanizada de M30		
15	<400> 76		
	atgggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctcgg cgcatatggc	60	
	gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc	120	
20	ctgagctgca gagccagcag ccgcctgac tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc	180	
	caggccccca gacctctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga	240	
25	ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tcagcagcct ggaacccgag	300	
	gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc	360	
	accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gcccctccg tgttcatctt cccccctcc	420	
30	gacgagcagc tgaagtccg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc	480	
	agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag	540	
35	agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg	600	
	agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg	660	
	agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt	699	
40	<210> 77		
	<211> 233		
	<212> PRT		
45	<213>Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223>Cadena ligera humanizada de M30		
	<400> 77		
50	Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser		
	1 5 10 15		
55	Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser		
	20 25 30		
	Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg		
	35 40 45		
60	Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg		
	50 55 60		
	Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg		
65	65 70 75 80		
	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser		
	85 90 95		

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

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

10 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

15 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

20 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

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

25 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

30 <210> 78
<211> 699
<212>ADN
<213>Secuencia Artificial

35 <220>
<223>Cadena ligera humanizada de M30

<400> 78
atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc 60

40 cagatcgtgc tgtcccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120

ctgacctgca gagccagcag caggctgac tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180

agcgccccca agccttgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240

45 ttttctggca gcggcagcgg caccagctac accctgacca tctccgcct ggaaccgag 300

gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc ccccaacctt cggccagggc 360

50 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gcccctccg tgttcatttt cccccctcc 420

gacgagcagc tgaagtccg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480

agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540

55 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgacctg 600

agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660

60 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 79
<211> 233
<212> PRT
65 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223>Cadena ligera humanizada de M30

<400> 79

5 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

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

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

15 Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

20 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

25 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

30 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

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

35 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

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

40 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

50

<210> 80

<211> 699

<212>ADN

<213>Secuencia Artificial

55

<220>

<223>Cadena ligera humanizada de M30

<400> 80

60 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc 60

gagatcgtgc tgaccagag cccgcccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120

ctgagctgca gagccagcag ccgcctgac tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180

65 caggccccca gacctctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat cccgcccaga 240

ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tcagccgcct ggaacccgag 300
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc 360
5 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcattctt cccccctcc 420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480
10 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccttgc agtcgggaa ctcccaggag 540
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaagccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660
15 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 81
<211> 233
20 <212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>Cadena ligera humanizada de M30
25 <400> 81

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15
30 Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

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

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60
40 Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

45 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

50 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140
55 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

60 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

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

65 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

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

5 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

10 <210> 82
<211> 699
<212>ADN
<213>Secuencia Artificial

15 <220>
<223>Cadena ligera humanizada de M30

20 <400> 82
atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc 60
gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120
ctgagctgca gagccagcag ccgcctgac tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180
caggccccca gacctctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240
25 ttttctggca gcggcagcgg caccgactac acctgacca tcagccgcct ggaacccgag 300
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccaacct cggccagggc 360
30 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gcccctccg tgttcatctt cccccctcc 420
gacgagcagc tgaagtccg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtccgggaa ctcccaggag 540
35 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660
40 agtcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

45 <210> 83
<211> 233
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

50 <220>
<223>Cadena ligera humanizada de M30

55 <400> 83
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 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45
60 Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60
65 Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg

	85	90	95
	Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser		
	100	105	110
5	Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		
	115	120	125
	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu		
10	130	135	140
	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro		
	145	150	155
	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly		
15	165	170	175
	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr		
	180	185	190
20	Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His		
	195	200	205
	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
	210	215	220
25	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	225	230	
30	<210> 84		
	<211> 1413		
	<212>ADN		
	<213>Secuencia Artificial		
35	<220>		
	<223>Cadena pesada humanizada de M30		
	<400> 84		
40	atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag		60
	gtgcagctgg tgcaagtctg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc		120
	tgcaaggcca gcggtctacac cttaccaac tacgtgatgc actgggtgcg ccaggcccct		180
45	gggcagggac tggaatgat gggctacatc aacccttaca acgacgacgt gaagtacaac		240
	gagaagttca agggcagagt gaccatcacc gccgacgaga gcaccagcac cgcctacatg		300
	gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag atggggctac		360
50	tacggcagcc cctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggt gacagtcagc		420
	tcagcctcca ccaagggcc aagcgtcttc ccctggcac cctcctcaa gagcacctct		480
55	ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg		540
	agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc		600
	tcaggactct actcctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag		660
60	acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag		720
	cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg		780
65	ggaccctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc		840
	cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac		900

tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtag 960
 aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
 5 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
 tccaaagcca aaggccagcc ccggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1140
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
 10 atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc 1260
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 15 tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctgca caaccactac 1380
 acccagaaga gcctctccct gtctccggc aaa 1413

 20 <210> 85
 <211> 471
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223>Cadena pesada humanizada de M30

 <400> 85

 30 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 35 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 40 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 65 70 75 80
 45 Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 50 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 55 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 60 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 65 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

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

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

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

10 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

55 <210> 86
 <211> 1413
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

60 <220>
 <223>Cadena pesada humanizada de M30

<400> 86
 atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60

65 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc 120

	tgcaaggcca gcggttacac cttaccaaac tacgtgatgc actgggtgcg ccaggcccct	180
	gggcagggac tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacgacgt gaagtacaac	240
5	gagaagttca agggcagagt gaccatcacc gccgacgaga gcaccagcac cgcctacatg	300
	gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag atggggctac	360
10	tacggcagcc ccctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggg gacagtcagc	420
	tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	480
	ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg	540
15	agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc	600
	tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	660
20	acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag	720
	cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg	780
	ggaccctcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	840
25	cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	900
	tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac	960
30	aacagcacgt accgggtggg cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1020
	aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1080
	tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag	1140
35	gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac	1200
	atcgccgtgg agtgggagag caatggccag ccgagaaaca actacaagac caccctccc	1260
	gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1320
40	tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1380
	accagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa	1413
45	<210> 87 <211> 471 <212> PRT <213>Secuencia Artificial	
50	<220> <223>Cadena pesada humanizada de M30 <400> 87	
55	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
	1 5 10 15	
	Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
	20 25 30	
60	Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
	35 40 45	
65	Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
	50 55 60	
	Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn	

	65		70		75		80									
	Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser
				85					90						95	
5	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
				100					105					110		
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe
10			115					120					125			
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
		130					135					140				
15	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
	145					150					155					160
	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
					165					170					175	
20	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
				180					185					190		
	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
25			195					200					205			
	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
		210					215					220				
30	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
	225					230					235					240
	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				245						250					255	
35	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
				260					265					270		
	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
40			275					280					285			
	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
		290					295					300				
45	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
	305					310					315					320
	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				325						330					335	
50	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
			340						345					350		
	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
55			355					360					365			
	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
		370					375					380				
60	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
	385					390					395					400
	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				405						410					415	
65	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
				420					425					430		

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

5

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

10 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 88

<211> 1413

15 <212>ADN

<213>Secuencia Artificial

<220>

20 <223>Cadena pesada humanizada de M30

<400> 88

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60

25 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcca ggggctacac cttcaccaac tacgtgatgc actgggtgaa acaggcccct 180

gggcagggcc tggaatggat cggctacatc aacccttaca acgacgacgt gaagtacaac 240

30 gagaagttca agggcaaggc caccatcacc gccgacgaga gcaccagcac cgcctacatg 300

gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag atggggctac 360

35 tacggcagcc ccctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggg gacagtcagc 420

tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccttggcac cctcctccaa gagcacctct 480

ggcggcacag ccgccttggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540

40 agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660

45 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780

ggaccctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctccgggacc 840

50 cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccccggga ggagcagtag 960

aacagcacgt accgggtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020

55 aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080

tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1140

60 gagatgacca agaaccaggc cagcctgacc tgcttgggtc aaggcttcta tcccagcgac 1200

atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc 1260

gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320

65 tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 1380

accagaaga gcctctccct gtctcccgcc aaa 1413

<210> 89
 <211> 471
 5 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial

 <220>
 <223>Cadena pesada humanizada de M30
 10
 <400> 89

 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 15 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 20 35 40 45
 Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 25 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 85 90 95
 30 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115 120 125
 35 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 40 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 45 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 50 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 55 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 60 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 65 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

	290		295		300	
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr					
	305		310		315	320
5	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp					
		325		330		335
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu					
10		340		345		350
	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg					
		355		360		365
15	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys					
		370		375		380
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp					
	385		390		395	400
20	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys					
		405		410		415
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser					
25		420		425		430
	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser					
		435		440		445
30	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser					
		450		455		460
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	465		470			
35						
	<210> 90					
	<211> 1413					
	<212>ADN					
40	<213>Secuencia Artificial					
	<220>					
	<223>Cadena pesada humanizada de M30					
45	<400> 90					
	atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag					60
	gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc					120
50	tgcaaggcca gcggtacac cttaccaac tacgtgatgc actgggtcaa gcaggcccct					180
	gggcagggcc tggaatgat cggtacatc aaccctaca acgacgacgt gaagtacaac					240
	gagaagttca agggcaaggc caccagacc agcgacaaga gcaccagcac cgcctacatg					300
55	gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag atggggctac					360
	tacggcagcc ccctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtcagc					420
60	tcagcctcca ccaagggcc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct					480
	ggcggcacag ccgcctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg					540
	agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc					600
65	tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag					660

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccacctgcc cagcacctga actcctgggg 780
5 ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 840
cctgaggtca catgctggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
10 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccccggga ggagcagtac 960
aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
15 tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgagg 1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag ccgagaaca actacaagac caccctccc 1260
20 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
25 acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

<210> 91
<211> 471
30 <212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223>Cadena pesada humanizada de M30
35

<400> 91

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15
40 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
45 Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60
50 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95
55 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125
60 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160
65

	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
					165					170					175		
5	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
				180					185					190			
	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
			195					200					205				
10	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
		210					215					220					
	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	
	225					230					235					240	
15	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				245						250					255		
	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
20				260					265					270			
	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
			275					280					285				
25	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
		290					295					300					
	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
	305					310					315					320	
30	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
				325						330					335		
	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
35				340					345					350			
	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
			355					360					365				
40	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
		370					375					380					
	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
	385					390					395					400	
45	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
				405						410					415		
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
50				420					425					430			
	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
			435					440					445				
55	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
		450					455					460					
	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
60						470											
	<210>	92															
	<211>	5															
	<212>	PRT															
65	<213>	Mus musculus															
	<400>	92															

Asn Tyr Val Met His
 1 5

5 <210> 93
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 93

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

15 Gly

20 <210> 94
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 94

Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <400> 95

Arg Ala Ser Ser Arg Leu Ile Tyr Met His
 1 5 10

40 <210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

45 <400> 96

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

50 <210> 97
 <211> 9
 <212> PRT

55 <213> Mus musculus
 <400> 97

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5

60

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 11 月 1 日(01.11.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/147713 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/060904
- (22) 国際出願日: 2012 年 4 月 24 日(24.04.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-097645 2011 年 4 月 25 日(25.04.2011) JP
61/478,878 2011 年 4 月 25 日(25.04.2011) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一三共株式会社 (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 秀 (TAKAHASHI, Shu). 松岡 達司 (MATSUOKA, Tatsuji). 村上 賢二 (MURAKAMI, Kenji). 滝沢 剛 (TAKIZAWA, Takeshi). 廣谷 賢志 (HIROTANI, Kenji). 浦野 敦司 (URANO, Atsushi). 福地 圭介 (FUKUCHI, Keisuke). 矢澤 光弘 (YAZAWA, Mitsuhiko).
- (74) 代理人: 石橋 公樹, 外 (ISHIBASHI Koki et al.); 〒1400005 東京都品川区広町一丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ANTI-B7-H3 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗 B 7-H 3 抗体

(57) Abstract: The present invention relates to an antibody which has a therapeutic effect on tumors. Namely, the present invention relates to an antibody which binds to B7-H3 and exhibits antitumor activity. The objective of the present invention is to provide a pharmaceutical product which has a therapeutic effect on tumors. An anti-B7-H3 antibody which binds to B7-H3 and exhibits antitumor activity is obtained, and a pharmaceutical product for treating tumors, which contains the antibody, or the like is obtained.

(57) 要約: 本発明は腫瘍に対して治療効果を有する抗体に関する。即ち、本発明は B 7-H 3 に結合して抗腫瘍活性を示す抗体に関する。本発明の課題は腫瘍に対して治療効果を有する医薬品を提供することである。B 7-H 3 に結合して抗腫瘍活性を示す抗 B 7-H 3 抗体を得て、当該抗体を含有する腫瘍治療用医薬組成物等を得る。

WO 2012/147713 A1

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

Daiichi Sankyo Company, Limited

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

Japan

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku, Tokyo 103-8426 Japan

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento, así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

name: _____

title: _____

legal representative(s) of

Daiichi Sankyo Company, Limited

an organization existing under the laws of

Japan

and in present execution of its business activity, domiciled at

3-5-1, Nihonbashi Honcho

Chuo-ku, Tokyo

103-8426 Japan

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to, conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at Tokyo, Japan

on this 31 day of March of 2008

Firma / signature: _____

Name: _____

UNE, Tsutomu

Title: Member of the Board and

Senior Executive Officer

SNKYO-1-30724 (FP-0623)

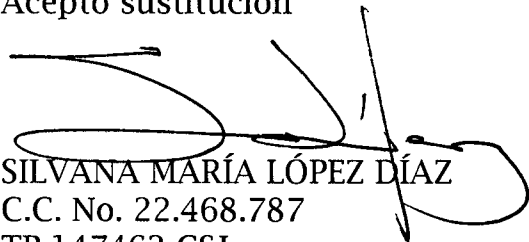
Yo, **DILIA RODRÍGUEZ D' ALEMAN**, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en Bogotá, Colombia, atentamente informo a usted que sustituyo el poder con que obró a la doctora **SILVANA MARÍA LÓPEZ DÍAZ**, domiciliada en Bogotá, identificada con la Cédula de Ciudadanía No. 22.468.787 y portadora de la tarjeta profesional No. 147.463 del CSJ, con las mismas facultades con que me fueron conferidas para este caso.

Señor Superintendente,



DILIA RODRIGUEZ D' ALEMAN
C.C. 41.654.882 de Bogotá
TP 20824 CSJ

Acepto sustitución



SILVANA MARÍA LÓPEZ DÍAZ
C.C. No. 22.468.787
TP 147463 CSJ

PRESENTACION PERSONAL

El anterior escrito fue presentado ante el
NOTARIO ONCE (E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ, D.C.
personalmente por DAVID A. DUELO

quien exhibió la c.c. 41651202

y Tarjeta Profesional No. 2003 (G.S.J.)

170 SEP 2013

Firma [Signature]
Fecha [Signature]



Nelson J. Sánchez García
NOTARIO (E)



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 112408

Bogotá D.C., Noviembre 05 de 2013 - 16:52:33

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	406756884	05/11/2013	72.360.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-275282- -00000-0000

Fecha: 2013-11-22 15:32:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 284

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 5 de 2013 - 16:52:59

283

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 119574

Bogotá D.C., Noviembre 22 de 2013 - 12:02:15

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	119511	22/11/2013		9.090.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
31	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	930.000.00
				\$930.000.00
			=====	

SON: **NOVECIENTOS TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-275282- -00000-0000

Fecha: 2013-11-22 15:32:05

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 284

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 22 de 2013 - 12:02:16

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-275282- -00000-0000

Fecha: 2013-11-22 15:32:05
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 284

PI02-F08 (2009-11-10)