

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 435**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04813771 .5**
96 Fecha de presentación: **10.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1691837**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Anticuerpos de IP-10 y sus usos**

30 Prioridad:
10.12.2003 US 529180 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.10.2012

73 Titular/es:
MEDAREX, INC.
707 STATE ROAD
PRINCETON, NJ 08540, US

72 Inventor/es:
DESHPANDE, Shrikant;
HUANG, Haichun;
SRINIVASAN, Mohan;
CARDARELLI, Josephine, M.;
WANG, Changyu;
PASSMORE, David;
RANGAN, Vangipuram, S.;
LANE, Thomas, E.;
KEIRSTEAD, Hans, S. y
LIU, Michael, T.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 388 435 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de IP-10 y sus usos

Antecedentes de la invención

5 La proteína inducible por Interferón gamma 10 (IP-10) (también conocida como CXCL10) es una quimiocina de 10kDa que se identificó originalmente basándose en la expresión del gen IP-10 en células tratadas con Interferón gamma (IFN-gamma) (Luster, A.D. y col. (1985) Nature 315:672-676). IP-10 muestra homología con proteínas que tienen actividad quimiotáctica, tales como factor de plaquetas 4 y beta-tromboglobulina, y con proteínas que tienen actividad mitogénica, tales como péptido activador de tejido conectivo III (Luster, A.D. y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2868-2871). IP-10 se secreta por una diversidad de células, incluyendo células endoteliales, monocitos, fibroblastos y queratinocitos, en respuesta a IFN-gamma (Luster, A.D. y Ravetch, J.V. (1987) J. Exp. Med. 166:1084-1097). También se ha mostrado que IP-10 está presente en macrófagos dérmicos y células endoteliales en respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en piel humana (Kaplan, G. y col. (1987) J. Exp. Med. 166:1098-1108). Aunque originalmente se identificó basándose en su inducción por IFN-gamma, IP-10 también puede inducirse por IFN-alfa, por ejemplo en células dendríticas (Padovan, E. y col. (2002) J. Leukoc. Biol. 71:669-676). La expresión de IP-10 también puede inducirse en células del sistema nervioso central, tales como astrocitos y microglía, por estímulos tales como IFN-gamma, virus y lipopolisacárido (Vanguri, R. y Farber, J.M. (1994) J. Immunol. 152:1411-1418; Ren, L.Q. y col. (1998) Brain Res. Mol. Brain Res. 59:256-263). La inmunobiología de IP-10 se revisa en, L.F. y col. (1997) Cytokine Growth Factor Rev. 8:207-219.

20 El receptor para IP-10 ha sido identificado como CXCR3, un receptor de siete transmembranas (Loetscher, M. y col. (1996) J. Exp. Med. 184:963-969). CXCR3 ha mostrado que se expresa en linfocitos T activados pero no en linfocitos T en reposo, ni en linfocitos B, monocitos o granulocitos (Loetscher, M. y col., mencionado anteriormente). Se ha mostrado que la expresión de CXCR3 se regula positivamente en células NK por estimulación con TGF-beta 1 (Inngjerdigen, M. y col. (2001) Blood 97:367-375). También se han identificado otros dos ligandos para CXCR3: MIG (Loetscher, M. y col., mencionado anteriormente) e ITAC (Cole, K.E. y col. (1998) J. Exp. Med. 187:2009-2021).

25 La unión de IP-10 con CXCR3 ha mostrado que media en la movilización de calcio y quimiotaxis en linfocitos T activados (Loetscher, M. y col., mencionado anteriormente). La quimiotaxis y movilización de calcio intercelular también se inducen por unión de IP-10 con CXCR3 en células NK activadas (Maghazachi, A.A. y col. (1997) FASEBJ. 11:765-774). Dentro del timo, se ha mostrado que IP-10 es un quimioatrayente de linfocitos T $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^+$, linfocitos T $TCR\gamma\delta^+$ y células de tipo NK (Romagnani, P. y col. (2001) Blood 97:601-607).

30 IP-10 o su receptor CXCR3 ha sido identificado en una diversidad de diferentes afecciones inflamatorias y autoinmunes, incluyendo esclerosis múltiple (véase por ejemplo, Sorensen, T.L. y col. (1999) J. Clin. Invest. 103:807-815), artritis reumatoide (véase por ejemplo, Patel, D.D. y col. (2001) Clin. Immunol. 98:39-45), colitis ulcerosa (véase, por ejemplo, Uguccioni, M. y col. (1999) Am. J. Pathol. 155:331-336), hepatitis (véase, por ejemplo, Narumi, S. y col. (1997) J. Immunol. 158:5536-5544), lesión de la médula espinal (véase, por ejemplo, McTigue, D.M. y col. (1998) J. Neurosci. Res. 53:368-376; Gonzalez y col. 2003. Exp. Neurol. 184:456-463), lupus eritematoso sistémico (véase, por ejemplo, Narumi, S. y col. (2000) Cytokine 12:1561-1565), rechazo de trasplantes (véase por ejemplo, Zhang, Z. y col. (2002) J. Immunol. 168:3205-3212), síndrome de Sjogren (véase, por ejemplo, Ogawa, N. y col. (2002) Arthritis Rheum. 46:2730-2741). En consecuencia, son deseables agentes terapéuticos que inhiben la actividad, en particular agentes que son adecuados para su uso en seres humanos.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a IP-10 y que muestran numerosas propiedades deseables. Estas propiedades incluyen unión de alta afinidad con IP-10 humana, así como reactividad cruzada con IP-10 de mono rhesus pero que carecen de reactividad cruzada sustancial con MIG humano, ITAC humano o IP-10 de ratón. Además, los anticuerpos inhiben la unión de IP-10 con su receptor, CXCR3, inhiben el flujo de calcio inducido por IP-10 en células que expresan receptor inhiben la migración de células inducida por IP-10 (quimiotaxis). Adicionalmente, se ha mostrado que los anticuerpos de la invención se unen a IP-10 en secciones del cerebro de un sujeto humano al que se ha diagnosticado esclerosis múltiple.

50 En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, comprendiendo dicho anticuerpo:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 43 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 92;
- (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 35 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 84; o
- 55 (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 39 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 88.

En realizaciones preferidas de la invención, la IP-10 humana comprende un polipéptido que tiene una secuencia de

5 aminoácidos como se expone en SEQ ID N° 121 [Genbank Acc. N° NP_001556]; el CXCR3 comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID N°: 122 [Genbank Acc. N° NP_001495]; la IP-10 de mono Rhesus comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID N°: 123 [Genbank Acc. N° AAK95955]; la IP-10 de ratón comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID N°: 124 [GenbankAcc. N° NP_067249]; el IMG comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID N°: 125 [Genbank Acc. N° NP_002407]; y/o el ITAC humano comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID N°: 126 [Genbank Acc. N° NP_005400].

10 Los anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo de un isotipo IgG1 o IgG4. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab o Fab'2, o anticuerpos de cadena sencilla.

15 La invención también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o parte de unión a antígeno del mismo, unido con un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radiactivo. La invención también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente que dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo.

También se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, o inuonoconjugado o molécula biespecífica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o parte de unión a antígeno de los mismos, de la invención también están abarcadas por la invención, así como vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos y células huésped que comprenden tales vectores de expresión. Además, la invención proporciona un ratón transgénico que comprende transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana, expresando el ratón un anticuerpo de la invención, así como hibridomas preparados de un ratóntal, en el que el hibridoma produce el anticuerpo de la invención.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 99) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 35) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 1D4. Las regiones CDR1 (SEQ ID N°: 1), CDR2 (SEQ ID N°: 13) y CDR3 (SEQ ID N°: 24) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V, D y J.

30 La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 110) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 84) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 1 D4. Las regiones CDR1 (SEQ ID N°: 51), CDR2 (SEQ ID N°: 62) y CDR3 (SEQ ID N°: 73) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

35 La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 100) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 36) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 1E 1. Las regiones CDR1 (SEQ ID N°: 2), CDR2 (SEQ ID N°: 14) y CDR3 (SEQ ID N°: 25) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

40 La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 111) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 85) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 1E1. Las regiones CDR1 (SEQ ID N°: 52), CDR2 (SEQ ID N°: 63) y CDR3 (SEQ ID N°: 74) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

45 La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 101) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 37) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2G1. Las regiones CDR1 (SEQ ID N°: 3), CDR2 (SEQ ID N°: 15) y CDR3 (SEQ ID N°: 26) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 112) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 86) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2G 1. Las regiones CDR1 (SEQ ID N°: 53), CDR2 (SEQ ID N°: 64) y CDR3 (SEQ ID N°: 75) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

50 La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 102) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 38) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3C4. Las regiones CDR1 (SEQ ID N°: 4), CDR2 (SEQ ID N°: 16) y CDR3 (SEQ ID N°: 27) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V, D y J.

55 La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 113) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 87) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 3C4. Las regiones CDR1 (SEQ ID

Nº: 54), CDR2 (SEQ IDNº: 65) y CDR3 (SEQ ID Nº: 76) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV y J.

5 La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 103) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 39) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 6A5. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 5), CDR2 (SEQ IDNº: 17) y CDR3 (SEQ ID Nº: 28) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV, D y J.

10 La Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 114) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 88) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 6A5. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 55), CDR2 (SEQ IDNº: 66) y CDR3 (SEQ ID Nº: 77) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV y J.

La Figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 104) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 40) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 6A8. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 6), CDR2 (SEQ IDNº: 18) y CDR3 (SEQ ID Nº: 29) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV y J.

15 La Figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 115) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 89) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 6A8. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 56), CDR2 (SEQ IDNº: 67) y CDR3 (SEQ ID Nº: 78) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV y J.

20 La Figura 7A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 105) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 41) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 6B10. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 7), CDR2 (SEQ IDNº: 19) y CDR3 (SEQ ID Nº: 30) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV, D y J.

25 La Figura 7B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 116) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 90) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 6B10. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 57), CDR2 (SEQ IDNº: 68) y CDR3 (SEQ ID Nº: 79) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV y J.

30 La Figura 8A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 106) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 42) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 7C10. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 8), CDR2 (SEQ IDNº: 20) y CDR3 (SEQ ID Nº: 31) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV, D y J.

La Figura 8B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 117) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 91) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 7C10. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 58), CDR2 (SEQ IDNº: 69) y CDR3 (SEQ ID Nº: 80) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV y J.

35 La Figura 9A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 107) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 43) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 8F6. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 9), CDR2 (SEQ IDNº: 21) y CDR3 (SEQ ID Nº: 32) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV, D y J.

40 La Figura 9B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 118) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 92) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 8F6. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 59), CDR2 (SEQ IDNº: 70) y CDR3 (SEQ ID Nº: 81) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV y J.

45 La Figura 10A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 108) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 44) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 10A12. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 10), CDR2 (SEQ ID Nº: 22) y CDR3 (SEQ ID Nº: 33) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV y J. Como alternativa, el resto de aminoácido 32 dentro de CDR1 puede mutarse de cisteína a serina (SEQ ID Nº: 11), lo que conduce a la secuencia VH de SEQ ID Nº: 45.

50 La Figura 10B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 119) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 93) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 10A12. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 60), CDR2 (SEQ IDNº: 71) y CDR3 (SEQ ID Nº: 82) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV y J.

55 La Figura 11A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nº: 109) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID Nº: 46) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 13C4. Las regiones CDR1 (SEQ ID Nº: 12), CDR2 (SEQ IDNº: 23) y CDR3 (SEQ ID Nº: 34) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinalV, D y J.

La Figura 11B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 120) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 94) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 13C4. Las regiones CDR1 (SEQ ID N°: 61), CDR2 (SEQ ID N°: 72) y CDR3 (SEQ ID N°: 83) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

5 La Figura 12 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 y 10A12 con la secuencia de aminoácidos de V_H 3-33 de línea germinal humana (SEQ ID N°: 47).

La Figura 13 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 6B10 y 8F6 con la secuencia de aminoácidos de V_H 3-30.3 de línea germinal humana (SEQ ID N°: 48).

10 La Figura 14 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 3C4 con la secuencia de aminoácidos de V_H 5-51 de línea germinal humana (SEQ ID N°: 49).

La Figura 15 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 13C4 con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-61 de línea germinal humana (SEQ ID N°: 50).

15 La Figura 16 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 y 13C4 con la secuencia de aminoácidos de V_K A27 de línea germinal humana (SEQ ID N°: 95).

La Figura 17 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 1E1, 6B10 y 8F6 con la secuencia de aminoácidos de V_K L6 de línea germinal humana (SEQ ID N°: 96).

20 La Figura 18 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 3C4 con la secuencia de aminoácidos de V_K L18 de línea germinal humana (SEQ ID N°: 97).

La Figura 19 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7C10 con la secuencia de aminoácidos de V_K L15 de línea germinal humana (SEQ ID N°: 98).

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos aislados, que se unen específicamente a IP-10 y que inhiben propiedades funcionales de IP-10.

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, comprendiendo dicho anticuerpo.

30 (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 43 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 92;
 (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 35 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 84; o
 (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 39 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 88.

35 La invención también proporciona inmunocombinados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunocombinados o moléculas biespecíficas de la invención.

Para que la presente invención se entienda más fácilmente, se definen primero ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales durante la descripción detallada.

40 Las expresiones "proteína inducible por interferón gamma 10" "IP-10," y "CXCL10" se usan de forma intercambiable, e incluyen variantes, isoformas y especies homólogas de IP-10 humana. En consecuencia, los anticuerpos humanos de la invención pueden, en ciertos casos, reaccionar de forma cruzada con IP-10 de especies distintas de ser humano. En otros casos, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para IP-10 humana y pueden no mostrar reactividad cruzada de especie o de otros tipos. La secuencia de aminoácidos completa de IP-10 humana tiene el número de acceso de Genbank NP_001556 (SEC ID N°: 121). La secuencia de aminoácidos completa de IP-10 de mono Rhesus tiene el número de acceso de Genbank AAK95955 (SEC ID N°: 123). La secuencia de aminoácidos completa de IP-10 de ratón tiene el número de acceso de Genbank NP_067249 (SEC ID N°: 124).

El término "CXCR3" se refiere al receptor para IP-10 (CXCL10). La secuencia de aminoácidos completa de CXCR3 tiene el número de acceso de Genbank NP_001495 (SEC ID N°: 122).

50 El término "MIG" se refiere a un ligando de CXCR3, también conocido como monoquina inducida por interferón gamma, que es distinto de IP-10. La secuencia de aminoácidos completa de MIG humana tiene el número de acceso de Genbank NP_002407 (SEC ID N°: 125).

El término "ITAC" se refiere a un ligando para CXCR3, también conocido como quimioatrayente alfa de linfocitos T inducible por interferón, que es distinto de IP-10. La secuencia de aminoácidos completa de ITAC humano tiene el número de acceso de Genbank NP_005400 (SEC ID N°: 126).

5 La expresión "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complementos) que da como resultado daño selectivo a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

10 Una "ruta de transducción de señal" se refiere a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señal que desempeñan un papel en la transmisión de una señal de una parte de una célula a otra parte de una célula. Como se usa en el presente documento, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de una señal tal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente invención es el receptor CXCR3 con el que se une la molécula IP-10.

15 El término "anticuerpo" como se denomina en el presente documento incluye una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de un antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de
20 cadena pesada está comprendida por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de
25 complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de amino-terminal a carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con tejidos o factores del huésped, incluyendo
diversas células del sistema inmune (por ejemplo células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

30 La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, IP-10). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de
35 unión abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de una rama sencilla de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región de determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque se codifican
40 los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , por genes separados, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, por un engarce sintético que permite que se realicen como una cadena proteica sencilla en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird y col. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla están abarcados dentro de la
45 expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se exploran con respecto a utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está
50 sustancialmente sin otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a IP-10 estando sustancialmente sin anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de IP-10). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a IP-10 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IP-10 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente sin otro material celular y/o compuestos químicos.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente
55 documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una especificidad de unión sencilla y afinidad por un epítipo particular.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen
60 regiones variables en las que las regiones tanto marco como CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva

de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una especificidad de unión sencilla que tienen regiones variables en las que derivan regiones tanto marco como CDR de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera fusionado con una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar al anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y se relacionan con secuencias V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por los genes de región constante de cadena pesada.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan de forma intercambiable en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno."

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente a IP-10 humana" pretende referirse a un anticuerpo que se une a IP-10 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, más preferentemente 2×10^{-9} M o menos, y aun más preferentemente 1×10^{-10} M o menos. Un anticuerpo que "reacciona de forma cruzada con IP-10 de mono rhesus" pretende referirse a un anticuerpo que se une a IP-10 de mono rhesus con una K_D de $0,5 \times 10^{-8}$ M o menos, más preferentemente 5×10^{-9} M o menos, y aun más preferentemente 2×10^{-9} M o menos. Un anticuerpo que "no reacciona de forma cruzada con IP-10 de ratón" o "no reacciona de forma cruzada con MIG humana" o "no reacciona de forma cruzada con ITAC humano" pretende referirse a un anticuerpo que se une a IP-10 de ratón, MIG humana o ITAC humano con una K_D de $1,5 \times 10^8$ M o mayor, más preferentemente una K_D de $5-10 \times 10^8$ M o mayor e incluso más preferentemente 1×10^7 M o mayor. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con IP-10 de ratón, MIG humana y/o ITAC humano muestran unión esencialmente indetectable frente a estas proteínas en ensayos de unión convencionales.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "inhibe la unión de IP-10 con CXCR3" pretende referirse a un anticuerpo que inhibe la unión de IP-10 con CXCR3 con una K_i de 1 nM o menos, más preferentemente 0,75 nM o menos, incluso más preferentemente 0,5 nM o menos y aun más preferentemente 0,25 nM o menos.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "inhibe el flujo de calcio inducido por IP-10" pretende referirse a un anticuerpo que inhibe flujo de calcio inducido por IP-10 con una CI_{50} de 10 nM o menos, más preferentemente 7,5 nM o menos, aun más preferentemente 5 nM o menos y aun más preferentemente 2,5 nM o menos.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "inhibe migración celular inducida por IP-10" pretende referirse a un anticuerpo que inhibe la migración celular inducida por IP-10 humana con una CI_{50} de 2 μ g/ml o menos, más preferentemente 1 μ g/ml o menos, o aun más preferentemente 0,5 μ g/ml o menos y aun más preferentemente 0,25 μ g/ml o menos.

El término " K_{asoc} " o " CI_a ", como se usa en el presente documento, pretenden referirse a la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " K_{dis} " o " K_d ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término " k_D ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante disociación, que se obtiene a partir de

la relación de K_d y K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos pueden determinarse usando procedimientos bien establecidos en la técnica. Un procedimiento preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, preferentemente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-8} M o menos, más preferentemente 10^{-9} M o menos y aun más preferentemente 10^{-10} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpo. por ejemplo, la unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, más preferentemente 10^{-8} M o menos.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. La expresión " animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Se describen diversos aspectos de la invención en más detalle en las siguientes sub-secciones.

Anticuerpos Anti-IP-10

- 15 Los anticuerpos de la invención se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a IP-10 humana. Los anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada con IP-10 de uno o más primates no humanos, tales como mono rhesus. Los anticuerpos no reaccionan de forma cruzada con IP-10 de ratón. Además, aunque MIG e ITAC también son ligandos para el receptor CXCR3, los anticuerpos de la invención no reaccionan de forma cruzada con MIG humana o ITAC humano.
- 20

Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a IP-10 con alta afinidad, por ejemplo con una K_D de 10^{-8} M o menos o 10^{-9} M o menos o incluso 10^{-10} M o menos.

- Además, los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir una o más actividades funcionales de IP-10. Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos inhiben la unión de IP-10 con CXCR3. En otra realización, los anticuerpos inhiben flujo de calcio inducido por IP-10. En otra realización más, los anticuerpos inhiben migración celular inducida por IP-10 (quimiotaxis).
- 25

- Se conocen en la técnica ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos por IP-10 de diversas especies y/o MIG o ITAC, incluyendo, por ejemplo, ELISA, transferencias de Western y RIA. Se describen ensayos adecuados en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos también puede evaluarse por ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como por análisis de Biacore. Los ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos en propiedades funcionales de IP-10 (por ejemplo, unión al receptor, flujo de calcio, quimiotaxis) se describen en más detalle en los Ejemplos.
- 30

- En consecuencia, un anticuerpo que "inhibe" una o más de estas propiedades funcionales de IP-10 (por ejemplo, actividades bioquímicas, inmuoquímicas, celulares, fisiológicas u otras biológicas, o similares) como se determina de acuerdo con metodologías conocidas en la técnica y descritas en el presente documento, se entenderá que se refiere a una reducción estadísticamente significativa de la actividad particular en relación con la vista en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando está presente un anticuerpo de control de especificidad irrelevante). Preferentemente un anticuerpo que inhibe una actividad de IP-10 efectúa una reducción estadísticamente significativamente tal en al menos 10% de parámetro medido, más preferentemente en al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, y en ciertas realizaciones preferidas un anticuerpo de la invención puede inhibir más del 92%, 94%, 95%, 97%, 98% o 99% de una actividad funcional de IP-10.
- 35
- 40

Anticuerpos monoclonales 1D4, 6A5 y 8F6

- Son anticuerpos preferidos de la invención los anticuerpos monoclonales humanos 1D4, 6A5 y 8F6, aislados y caracterizados estructuralmente como se describe en los Ejemplos 1 y 2. La secuencia de aminoácidos V_H de 1D4, 6A5 y 8F6 se demuestran en SEC ID N°: 35, 39 y 43, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos V_L de 1D4, 6A5 y 8F6 se muestran en SEC ID N°: 84, 88 y 92, respectivamente.
- 45

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o parte de unión a antígeno del mismo que comprende:

- 50 (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 92;
- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 84; o
- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 39; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 88.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 V_H de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S y 13C4 se muestran en SEC ID N°: 1-12. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 V_H de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 y 13C4 se muestran en SEC ID N°: 13-23. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 y 13C4 se muestran en SEC ID N°: 24-34. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 V_K de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 y 13C4 se muestran en SEC ID N°: 51-61. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 V_K de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 y 13C4 se muestran en SEC ID N°: 62-72. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 V_K de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 y 13C4 se muestran en SEC ID N°: 73-83. Las regiones CDR se delimitan usando el sistema de Kabat (Kabat, E. A., y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N°. 91-3242).

Anticuerpos que tienen secuencias de línea germinal particulares

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal particular.

Como se demuestra en el presente documento, se han preparado anticuerpos humanos específicos para IP-10 que comprenden una región variable de cadena pesada que es el producto de, o deriva de, un gen VH 3-33, gen VH 3-30.3, gen VH 5-51 o gen VH 4-61 de línea germinal humana.

Los anticuerpos de la invención comprenden una región variable de cadena pesada que es el producto de, o deriva de, un gen de línea germinal VH humano seleccionado de VH 3-33 o VH 3-30.3.

Como se demuestra también en el presente documento, se han preparado anticuerpos humanos específicos para IP-10 que comprenden una región variable de cadena ligera que es el producto de o deriva de un gen V_K A27, gen V_K L15, gen V_K L6 o gen V_K L18 de línea germinal humana. Los anticuerpos de la invención comprenden una región variable de cadena ligera que es el producto de o deriva de un gen de línea germinal V_K humano seleccionado de V_K A27 o V_K L6.

Los anticuerpos son específicos para un polipéptido IP-10 humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de N° de acceso de Genbank NP_001556). Los ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_K de VH 3-33 y V_K A27, respectivamente, incluyen 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 y 10A12S. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de VH 3-33 y V_K L15, respectivamente, es 7C10. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de VH 3-33 y V_K L6, respectivamente, es 1E1. Los ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_K de VH 3-30.3 y V_K L6, respectivamente, incluyen 6B10 y 8F6. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de VH 5-51 y V_K L18, respectivamente, es 3C4. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de VH 4-61 y V_K A27, respectivamente, es 13C4.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que son "el producto de" o "derivan de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o explorar una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana presentada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que es más cercana en secuencia (es decir, mayor porcentaje de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o introducción intencionada de mutación dirigida. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene restos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se comprara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otra especie (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular no presentará más de 10 diferencias de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede no presentar más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácido de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Anticuerpos que se unen al mismo Epítopo que anticuerpos Anti-IP-10 de la invención

También se desvelan anticuerpos que se unen al mismo epítopo que los diversos anticuerpos anti IP-10 de la invención proporcionada en el presente documento, tales como otros anticuerpos humanos que se unen al mismo

epítopo que los anticuerpos 1D4, 6A5 u 8F6 descritos en el presente documento. Tales anticuerpos adicionales pueden identificarse basándose en su capacidad para competir de forma cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de una manera estadísticamente significativa) con los anticuerpos 1D4, 6A5 o 8F6 en ensayos de unión de IP-10 convencionales. La capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión de, por ejemplo, 1D4, 6A5 o 8F6 con IP-10 humana demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con ese anticuerpo con respecto a unión con IP-10 humana; un anticuerpo tal puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo epítopo o uno relacionado (por ejemplo, uno estructuralmente similar o espacialmente próximo) en IP-10 humana que el anticuerpo con el que compete. En una realización preferida, el anticuerpo que se une al mismo epítopo en IP-10 humana que 1D4, 6A5 u 8F6 es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en los Ejemplos.

Moléculas de Ácido nucleico que codifican anticuerpos de la Invención

Otro aspecto de la invención concierne a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se hace sustancialmente puro" cuando se separa por purificación de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, formación de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la materia. Véase, F. Ausubel, y col. ed. (1987) *Currant Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular convencionales. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe adicionalmente posteriormente) pueden obtenerse ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo preparado por el hibridoma por amplificación por PCR convencional o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos a partir de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de presentación de fagos), puede recuperarse ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la biblioteca.

Son moléculas de ácido nucleico particulares de la invención las que codifican las secuencias VH y VL de los anticuerpos monoclonales 6A5, 8F6 y 1D4. Otros ácidos nucleicos desvelados son los que codifican las secuencias VH y VL de los anticuerpos monoclonales 1E1, 2G1, 3C4, 6A8, 6B10, 7C10, 10A12 o 13C4. Se muestran las secuencias de ADN que codifican las secuencias VH de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 y 13C4 en SEC ID N°: 99 -109, respectivamente. Se muestran secuencias de ADN que codifican las secuencias VL de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B 10, 7C10, 8F6, 10A12 y 13C4 en SEC ID N°: 110-120, respectivamente.

Una vez que se han obtenido los fragmentos de ADN que codifican segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un engarce flexible. La expresión "unido operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de tal modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en fase.

El ADN aislado que codifica la acción de VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N°. 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones por amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferentemente es una región constante IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab el ADN que codifica VH puede unirse operativamente con otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse a un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N°. 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones por amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferentemente es una región constante kappa.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un engarce flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄ - Ser)₃, de modo que las secuencias VH y VL puedan expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por engarce flexible (véase por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-426; Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty y col., (1990) Nature 348:552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales de la invención

Pueden producirse anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente por una diversidad de técnicas, incluyendo metodología de anticuerpos monoclonales convencional por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpo monoclonal, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Se conocen en la materia protocolos de inmunización y técnicas para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

Pueden prepararse anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. Puede obtenerse ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera a partir del hibridoma murino de interés y modificarse por ingeniería genética para que contengan secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas usando procedimientos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos N°. 4.816.567 de Cabilly y col.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en un armazón humano usando procedimientos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos N°. 5.225.539 de Winter, y Patentes de Estados Unidos N°. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen y col.)

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IP-10 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones que se denominan en el presente documento ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones de Ig humana."

El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene miniloci génicos de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y cadena ligera κ humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos (véase por ejemplo, Lonberg, y col. (1994) Nature 368(6474): 856-859). En consecuencia, los ratones muestran expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar IgG κ humano monoclonal de alta afinidad (Lonberg, N. y col. (1994), mencionado anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas portadas por tales ratones, se describe adicionalmente en Taylor, L. y col. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. y col. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuaille y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi y col. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. y col. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaille y col. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. y col. (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, D. y col. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véase adicionalmente, Patentes de Estados Unidos N°. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; Patente de Estados Unidos N°. 5.545.807 de Surani y col.; Publicación de PCT N°. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y Publicación de PCT N°. WO 01/14424 de Korman y col.

En otra realización, pueden inducirse anticuerpos humanos de la invención usando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Tales ratones, denominados en el presente documento "ratones KM", se describen en detalle en la Publicación de PCT WO 02/43478 de Ishida y col.

Adicionalmente, están disponibles en la técnica sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para inducir anticuerpos anti-IP-10 de la invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); tales ratones se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N°. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati y col.

Además, están disponibles en la técnica sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de

5 inmunoglobulina humana y pueden usarse para inducir anticuerpos anti-IP-10 de la invención, por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka y col. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humanos (Kuroiwa y col. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) y pueden usarse para inducir anticuerpos anti-IP-10 de la invención.

10 También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos de la invención usando procedimientos de presentación en fagos para explorar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales procedimientos de presentación de fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véase por ejemplo; Patentes de Estados Unidos N°. 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner y col.; Patentes de Estados Unidos N°. 5.427.908 y 5.580.717 de Dower y col.; Patentes de Estados Unidos N°. 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty y col.; Patentes de Estados Unidos N°. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths y col.

15 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos de la invención usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunes humanas de modo que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras su inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N°. 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson y col.

Inmunización de ratones de Ig humana

20 Cuando se usan ratones de Ig humana para inducir anticuerpos humanos de la invención, tales ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada enriquecida de antígeno IP-10 y/o IP-10 recombinante, o una proteína de fusión de IP-10, como se describe en Lonberg, N. y col. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. y col. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; y Publicación de PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada recombinante (5-50 µg) de antígeno IP-10 para inmunizar los ratones de Ig humana por vía intraperitoneal.

25 Se describen procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para IP-10 en el Ejemplo 1 posterior. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha mostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund seguido de inmunizaciones IP cada dos semanas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, también se ha descubierto que otros adyuvantes distintos del de Freund son eficaces. Además, se ha descubierto que las células completas en ausencia de adyuvante son altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede supervisarse durante el transcurso del protocolo de inmunización obteniéndose muestras de plasma por sangrados retro-orbitales. El plasma puede explorarse mediante ELISA (como se describe posteriormente), y pueden usarse ratones con suficientes titulaciones de inmunoglobulina humana anti-IP-10 para fusiones. Los ratones pueden estimularse por vía intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y retirada del bazo. Se espera que puedan necesitarse 2-3 fusiones para cada inmunización. Típicamente se inmunizan entre 6 y 24 ratones para cada antígeno. Habitualmente se usan cepas tanto HCo7 como HCo12. Además, pueden criarse juntos transgenes tanto HCo7 como HCo12 en un ratón sencillo que tiene dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12).

Generación de Hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la Invención

40 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, pueden aislarse esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden explorarse con respecto a la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse sucesiones celulares sencillas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células se siembran a aproximadamente 2×10^5 en placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero de clon fetal 20%, medio acondicionado "653" 18%, origen 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, penicilina 50 unidades/ml, estreptomycin 50 mg/ml, gentamicina 50 mg/ml y HAT 1X (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión).

50 Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el que el HAT se reemplaza con HT. Después pueden explorarse pocillos individuales por ELISA con respecto a anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce crecimiento de hibridoma extensivo, puede observarse el medio habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden volver a sembrarse en placas, explorarse de nuevo, y si aún son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden cultivarse después *in vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de agitación de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG

eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución de tampón puede intercambiarse a PBS, y la concentración puede determinarse por DO280 usando coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden separarse en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

5 Generación de Transfectomas que producen anticuerpos monoclonales de la Invención

También pueden producirse anticuerpos de la invención en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y procedimientos de transfección génica como se conocen bien en la materia (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden obtenerse ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud completa o parcial, por técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión tales que los genes se unan operativamente a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "unido operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga a un vector de modo que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector cumplen su función pretendida de regular la transcripción y traducción de gen del anticuerpo. El vector de expresión y la secuencia de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por procedimientos convencionales (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado de modo que el segmento V_H esté unido operativamente con el segmento o los segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_L esté unido operativamente con el segmento C_L dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido o señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal se una en fase con el extremo amino terminal del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no de inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Se apreciará por los expertos en la materia que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de tales factores como la elección de la célula huésped para transformar, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en célula huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión proteica en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. Como alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o promotor de β -globina. Adicionalmente, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor de SR α , que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga de virus de leucemia de linfocitos T humanos de tipo 1. (Takebe, Y. y col. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N^o. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel y col.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

Para expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan a una célula huésped por técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia diversidad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato cálcico, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible

expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente células huésped de mamífero, es la más preferida debido a que tales células eucariotas, y en particular células de mamífero, tienen más probabilidades que las células procariotas de ensamblar y secretar un anticuerpo plegado de forma apropiada e inmunológicamente activo. Se ha notificado que la expresión procariota de genes de anticuerpo es ineficaz para producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario deHámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr- descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.*159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de gen GS desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para remitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se dejan crecer las células huésped. Pueden recuperarse anticuerpos del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de proteínas convencionales.

Caracterización de unión de Anticuerpo con Antígeno

Pueden ensayarse anticuerpos de la invención para unión con IP-10, por ejemplo, mediante ELISA convencional. En resumen, se revisten placas de microtitulación con IP-10 purificada a 0,25 µg/ml en PBS, y después se bloquean con albúmina de suero bovino 5% en PBS. Se añaden diluciones de anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma de ratones inmunizados para IP-10) a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween y después se incuban con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico de Fc anti IgG humana de cabra) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar, las placas se revelan con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a DO de 405-650. Preferentemente, se usarán ratones que desarrollan las titulaciones más altas para fusiones.

También puede usarse un ensayo de ELISA como se ha descrito anteriormente para explorar con respecto a hibridomas que muestran reactividad positiva con inmunógeno IP-10. Se subclonan hibridomas que se unen con alta avidez a IP-10 y se caracterizan adicionalmente. Puede seleccionarse un clon de cada hibridoma, que conserva la reactividad de las células parentales (por ELISA) para preparar un banco de células de 5-10 viales almacenado a -140 °C y para purificación de anticuerpos.

Para purificar anticuerpos anti-IP-10, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de agitación de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Farmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución de tampón puede cambiarse a PBS, y la concentración puede determinarse por DO₂₈₀ usando coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden separarse en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-IP-10 seleccionados se unen a epítopos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos disponibles en el mercado (Pierce, Rockford, IL). Pueden realizarse estudios de competición usando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados usando placas de ELISA revestidas con IP-10 como se ha descrito anteriormente. La unión de mAb biotinilado puede detectarse con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ELISA de isotipo usando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, pueden revestirse pocillos de placas de microtitulación con 1 µg/ml de inmunoglobulina anti-humana durante una noche a 4 °C. Después de bloquear con BSA al 1%, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de ensayo o controles de isotipo purificado, a temperatura ambiente durante una a dos horas. Los pocillos pueden hacerse reaccionar después con sondas conjugadas de fosfatasa alcalina específicas de IgG1 humana o IgM humana. Las placas se revelan y analizan como se ha descrito anteriormente.

Pueden ensayarse adicionalmente IgG humanas anti IP-10 con respecto a reactividad con antígeno IP-10 por transferencia de Western. En resumen, pueden prepararse IP-10 y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico. Después de electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternero fetal 10% y se exploran con los anticuerpos monoclonales para ensayar. Puede detectarse la unión de IgG humana usando fosfatasa alcalina anti-IgG humana y revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Inmunconjugados

En otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo anti IP-10, o un fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan en el presente documento "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas." Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, destruya) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tio-guanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, streptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina de platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliqueamicina está disponible en el mercado (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Pueden conjugarse citotoxinas con anticuerpos de la invención usando tecnología de engarce disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de engarce que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, engarces que contienen hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y péptidos. Puede seleccionarse un engarce que sea, por ejemplo, susceptible a escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosomal o susceptible a escisión por proteasas tales como proteasas preferentemente expresadas en tejido tumoral tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para análisis adicional de tipos de citotoxinas, engarces y procedimientos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito, G. y col. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. y col. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

También pueden conjugarse anticuerpos de la presente invención con un isótopo radiactivo para generar compuestos radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados radioinmunconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso para diagnóstico o de forma terapéutica incluyen, pero sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Están establecidos en la técnica procedimientos para preparar radioinmunconjugados. Están disponibles en el mercado ejemplos de radioinmunconjugados, incluyendo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y puede usarse procedimientos similares para preparar radioinmunconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada y el resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón γ ; o modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Se conocen bien técnicas para conjugar dicho resto terapéutico con anticuerpos, véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies y Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson y col. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera y col. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Moléculas Biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti IP-10, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o partes de un antígeno del mismo, puede derivatizarse o unirse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo

- o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une al menos a dos sitios de unión diferentes o moléculas diana. El anticuerpo de la invención puede de hecho derivatizarse o unirse a más de una molécula funcional adicional para generar moléculas biespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; también se pretende que tales moléculas multiespecíficas estén abarcadas por la expresión "molécula biespecífica" como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede unirse funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más moléculas de unión distintas, tales como otro anticuerpo, fragmento del anticuerpo, péptido o mimético de unión, de modo que resulte una molécula biespecífica.
- En consecuencia, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para IP-10 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana. En una realización particular de la invención, el segundo epítipo diana es un receptor de Fc, por ejemplo, Fc γ RI humano (CD64) o un receptor de Fc α humano (CD89). Por tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de unirse a células efectoras que expresan Fc γ R, Fc α R o Fc ϵ R (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), y a células diana que expresan IP-10. Estas moléculas biespecíficas dirigen la células que expresan IP-10 a células electoras y desencadenan actividades de células efectoras mediadas por receptor de Fc, tales como fagocitosis de una célula que expresa IP-10, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), liberación de citocinas o generación de anión superóxido.
- En una realización de la invención en la que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir adicionalmente una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti IP-10. En una realización, la tercera especificidad de unión es una parte anti factor de potenciación (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en actividad citotóxica y de este modo aumenta la respuesta inmune frente a la célula diana. La "parte anti factor de potenciación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor y de este modo da como resultado una potenciación del efecto de los determinantes de unión para el receptor de Fc o antígeno de célula diana. La "parte anti factor de potenciación" puede unirse a un receptor de Fc o un antígeno de célula diana. Como alternativa, la parte anti factor de potenciación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad con la que se unen la primera y segunda especificidades de unión. Por ejemplo, la parte anti factor de potenciación puede unirse a un linfocito T citotóxico (por ejemplo mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que dé como resultado una respuesta inmune aumentada frente a la célula diana).
- En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena sencilla como se describe en Ladner y col. Patente de Estados Unidos N°. 4.946.778.
- En una realización, la especificidad de unión para un receptor de Fc γ se proporciona por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por inmunoglobulina G humana (IgG). Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena γ localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce transmembranas o isoformas de receptor soluble que se agrupan en tres clases de receptor de Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), y Fc γ RIII (CD16). En una realización preferida, el receptor de Fc γ es un Fc γ RI de alta afinidad humano. El Fc γ RI humano es una molécula de 72 kDa que muestra alta afinidad por IgG monomérico (10^8 - 10^9 M⁻¹).
- La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fc γ preferidos se describe por Fanger y col. en la Publicación de PCT WO 88/00052 y en la Patente de Estados Unidos N°. 4.954.617. Estos anticuerpos se unen en un epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII en un sitio que es distinto del sitio de unión con Fc γ del receptor y, por lo tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Son anticuerpos anti-Fc γ RI específicos útiles en la presente invención mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 está disponible de la Colección Americana de cultivos tipo, N° de acceso de ATCC HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo antirreceptor de Fc γ es una forma humanizada de anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, RF, y col. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 y Publicación de PCT WO 94/10332. La línea celular productora de anticuerpos H22 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo con la designación HA022CL1 y tiene el N° de acceso CRL 11177.
- En otras realizaciones preferidas más, la especificidad de unión para un receptor de Fc se proporciona por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, por ejemplo, un receptor de Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), cuya unión preferentemente no se bloquea por inmunoglobulina humana A (IgA). La expresión "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen α (Fc α RI) localizado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembrana de corte y empalme alternativo de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) se expresa de forma constitutiva en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc α RI tiene afinidad media ($\approx 5 \times 10^7$ M⁻¹) tanto para IgA1 como para IgA2, que aumenta tras su exposición

a citocinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. y col. (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc α RI fuera del dominio de unión a ligando IgA (Monteiro, R.C. y col. (1992) *J. Immunol.* 148: 1764).

5 Fc α RI y Fc γ RI son receptores accionadores preferidos para su uso que las moléculas biespecíficas de la invención debido a que (1) se expresan principalmente en células receptoras primarias, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5.000 – 100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); (4) median en la presentación antigénica potenciada de antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos a ellos.

10 Aunque se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales humanizados, murinos y quiméricos.

15 Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-IP-10, usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y después conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, puede usarse una diversidad de agentes de acoplamiento o reticulación para conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky y col. (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA y col. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:648). Otros procedimientos incluyen los descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* N $^{\circ}$. 78, 118-132; Brennan y col. (1985) *Science* 229:81-83), y Glennie y col. (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Son agentes de conjugación preferidos SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

20 Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, estos pueden conjugarse mediante enlace de sulfhidrilo de las regiones bisagra C terminales de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región bisagra se modifica para contener un número impar de restos de sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

25 Como alternativa, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este procedimiento es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F (ab') $_2$ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molecular biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Se describen procedimientos para preparar moléculas biespecíficas por ejemplo en la Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 5.260.203; Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 5.455.030; Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 4.881.175; Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 5.132.405; Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 5.091.513; Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 5.476.786; Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 5.013.653; Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 5.258.498; y Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 5.482.858.

30 La unión de las moléculas biespecíficas con sus dianas específicas puede confirmarse, por ejemplo, por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia de Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden detectarse usando por ejemplo, un anticuerpo ligado a enzima o un fragmento de anticuerpo que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. Como alternativa, los complejos pueden detectarse usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse de forma radiactiva y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, marzo, 1986). El isótopo radiactivo puede detectarse por tales medios como el uso de un contador γ o un contador de centelleo o por autorradiografía.

50 Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o parte o partes de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo dos o más diferentes) anticuerpos, o 55 inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es

decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-IP-10 de la presente invención combinado con al menos otro agente inmunosupresor o antiinflamatorio. Se describen ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en terapia de combinación con mayor detalle posteriormente en la sección sobre usos de los anticuerpos de la invención.

- 5 Como se usa en el presente documento "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medio de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el
10 anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, puede revestirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

- Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables: una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no transmite ningún efecto toxicológico no deseado (véase por ejemplo, Berge, S.M., y col. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases.
15 Las sales adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenil-sustituidos, ácidos hidroxil alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y sulfónicos aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas
20 orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

- Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfato sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamin tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.
25

- Los Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, ácidos vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato. Puede mantenerse fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.
30

- Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, mencionado anteriormente, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones.
35 Además, puede producirse absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.
40

- Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.
45

- Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de preparación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede producirse absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.
50
55

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera,

seguido de microfiltración de esterilización. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado en vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación sencilla variará dependiendo del sujeto que se trate, y el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica sencilla generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. En general, de cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 99% de principio activo, preferentemente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 70%, más preferentemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 30% de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una embolada sencilla, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma farmacéutica unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma farmacéutica unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas farmacéuticas unitarias de la invención se dictan por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea conseguir y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la preparación de compuestos de un compuesto activo tal para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada 3 a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-IP-10 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, proporcionándose el anticuerpo usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos procedimientos, se administran dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado queda dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones sencillas pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique por la medición de los niveles en sangre de anticuerpo para el antígeno diana en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpos en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos procedimientos aproximadamente 25-300 µg/ml.

Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación prolongada, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguido de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo largo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere en ocasiones una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad y preferentemente hasta que el paciente muestra alivio parcial o completo de los síntomas de la enfermedad. A continuación, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad de principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster sal o amida de las mismas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial

médico previo del paciente que se trate, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

Una “dosificación terapéuticamente eficaz” de un anticuerpo anti-IP-10 de la invención preferentemente da como resultado una reducción de la gravedad de síntomas de enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de periodos sin síntomas de enfermedad o una prevención de deterioro o discapacidad debido a la enfermedad. En el caso de artritis reumatoide (AR), una dosis terapéuticamente eficaz preferentemente evita deterioro adicional de los síntomas físicos asociados con AR, tales como, por ejemplo, dolor, fatiga, rigidez matinal (de más de una hora de duración), dolores musculares difusos, pérdida de apetito, debilidad, dolor de las articulaciones con calor, hinchazón, dolor y rigidez de una articulación después de inactividad. Una dosis terapéuticamente eficaz preferentemente también previene o retarda la aparición de AR tal como puede desearse cuando están presentes señales tempranas o preliminares de la enfermedad. De forma similar incluye retardar la progresión crónica asociada con AR. Los ensayos de laboratorio utilizados en el diagnóstico de AR incluyen química (incluyendo la medición de los niveles de IP-10), hematología, serología y radiología. En consecuencia, cualquier ensayo clínico o bioquímico que controle cualquiera de los anteriores puede usarse para determinar si un tratamiento particular es una dosis terapéuticamente eficaz para tratar AR. Un experto habitual en la materia sería capaz de determinar tales cantidades basándose en tales factores como la talla del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o vía de administración particular seleccionada.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías preferidas de administración para anticuerpos de la invención incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase “administración parenteral” como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, infusión e inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Como alternativa, un anticuerpo de la invención puede administrarse mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vagina, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto frente a liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implante, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenvinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Pueden administrarse composiciones terapéuticas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: Patente de Estados Unidos N° 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para distribuir medicación a una velocidad controlada; Patente de Estados Unidos N° 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente de Estados Unidos N° 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una tasa de infusión precisa; Patente de Estados Unidos N° 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro de fármaco continuo; Patente de Estados Unidos N° 4.439.196, que desvela un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y Patente de Estados Unidos N° 4.475.196, que desvela un sistema de suministro de fármaco osmótico. Muchos otros implantes, sistema de suministro y módulos tales se conocen por los expertos en la materia.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), estos pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para procedimientos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de forma selectiva a células u órganos específicos, potenciar de este modo el suministro de fármacos dirigido (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Los restos de dirección ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.416.016 de Low y col.); manósidos (Umezawa y col., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y col. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais y col. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A tensioactiva (Briscoe y col. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier y col. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler

(1994) Immunomethods 4:273.

Usos y Procedimientos

Los anticuerpos (e inmunocombinados y moléculas biespecíficas) desvelados en el presente documento tienen utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o en un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de trastornos. El término "sujeto" como se usa en el presente documento pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los procedimientos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con expresión de IP-10 aberrante. Cuando se administran anticuerpos para IP-10 junto con otro agente, los dos pueden administrarse en orden o simultáneamente.

Los anticuerpos (e inmunocombinados y moléculas biespecíficas) de la invención pueden usarse para detectar niveles de IP-10, o niveles de células que contienen IP-10. Esto puede conseguirse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra (tal como una muestra *in vitro*) y una muestra de control con el anticuerpo anti-IP-10 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo e IP-10. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo e IP-10 se detecta y compara en la muestra y el control. Por ejemplo, pueden realizarse procedimientos de detección convencionales, bien conocidos en la técnica, tales como ELISA y ensayos citométricos de flujo usando las composiciones de la invención.

En consecuencia, se desvelan en el presente documento procedimientos para detectar la presencia de IP-10 (por ejemplo, antígeno IP-10 humano) en una muestra o medir la cantidad de IP-10, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo de la invención, o una parte de un antígeno del mismo, que se une específicamente a IP-10. En condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte del mismo e IP-10. Se detecta después la formación de un complejo, en el que una diferencia de la formación del complejo entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de IP-10 en la muestra.

También se desvelan en el presente documento kits que comprenden las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, anticuerpos humanos, inmunocombinados y moléculas biespecíficas) de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener adicionalmente al menos un reactivo adicional o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tenga una actividad complementaria que se una a un epítipo en el antígeno diana distinto del primer anticuerpo). Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier escrito, o material grabado proporcionado en o con el kit o que acompaña de otro modo al kit.

IP-10 tendrá ahora un efecto quimioatrayente en linfocitos T activados y linfocitos NK y para reclutar tales células a sitios de inflamación y respuestas autoinmunes. En consecuencia, los anticuerpos anti-IP-10 (e inmunocombinados y moléculas biespecíficas) de la invención pueden usarse para inhibir respuesta inflamatoria o autoinmune mediada por linfocitos T activados y/o linfocitos NK en una diversidad de indicaciones clínicas. Se desvela en el presente documento un procedimiento para inhibir una respuesta inflamatoria o autoinmune mediada por los linfocitos T activados y/o linfocitos NK que comprende poner en contacto los linfocitos T o linfocitos NK con un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención (o inmunocombinado o molécula biespecífica de la invención) de modo que se inhibe la respuesta inflamatoria o autoinmune. Los ejemplos específicos de afecciones inflamatorias o autoinmunes en las que pueden usarse los anticuerpos incluyen, pero sin limitación, los siguientes:

A. Esclerosis múltiple y otras enfermedades Desmielinizantes

La expresión de ARNm de IP-10 ha mostrado que aumenta en encefalomielitis alérgica experimental murina (EAE), un modelo de ratón de esclerosis múltiple (Godiska, R. y col. (1995) J. Neuroimmunol. 58:167-176). Además, se han descubierto niveles aumentados de IP-10 en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM durante acontecimientos desmielinizantes agudos (Sorensen, T.L. y col. (1999) J. Clin. Invest. 103:807-815; Franciotta y col. (2001) J. Neuroimmunol. 115:192-198). También se ha mostrado que IP-10 se expresa por astrocitos en lesiones de EM, pero no en materia blanca no afectada (Balashov, K.E. y col. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6873-6878) y que se expresa por macrófagos dentro de placas de EM y por astrocitos reactivos en el parénquima circundante (Simpson, J.E. y col. (2000) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 26:133-142). La Publicación de Patente PCT WO 02/15932 mostró que la administración de anticuerpos anti-IP-10 en un modelo de virus de hepatitis de ratón (MHV) de EM dio como resultado invasión de macrófagos y linfocitos T reducida, inhibió la progresión de desmielinización, aumentó la remielinización y mejoró la función neurológica (véase también Liu, M.T. y col. (2001) J. Immunol. 167:4091-4097). También se ha mostrado que la administración de anticuerpos anti-IP-10 murinos reduce la incidencia y gravedad de enfermedad clínica e histológica en EAE murina (Fife, B.T. y col. (2001) J. Immunol. 166:7617-7624).

En vista de lo anterior, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de EM y otras enfermedades desmielinizantes administrando un anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo

puede usarse solo o en combinación con otros agentes anti-EM, tales como interferón beta-1a (por ejemplo, Avonex®, Rebif®), interferón beta-1b (por ejemplo, Betaseron®), acetato de glatiramer (por ejemplo, Copaxone®) y/o mitoxantrona (por ejemplo, Novantrone®).

B. Artritis reumatoide

5 Los niveles de IP-10 han mostrado que elevan significativamente en el fluido sinovial, tejido sinovial y suero de pacientes con artritis reumatoide (AR) (Patel, D.D. y col. (2001) Clin. Immunol. 98:39-45; Hanaoka, R. y col. (2003) Arthritis Res. y Therapy 5:R74-R81). Se ha mostrado que el receptor de IP-10, CXCR3, se expresa preferentemente en mastocitos dentro de tejido sinovial de pacientes con AR (Ruschpler, P. y col. (2003) Arthritis Res. Ther. 5:R241-R252). En un modelo de rata de artritis inducida por adyuvante (AA), se ha notificado una respuesta de autoanticuerpos detectable frente a IP-10 propio (Salomon, I. y col. (2002) J. Immunol. 169:2685-2693). Además, la administración de una vacuna de ADN que codificaba IP-10 aumentó la producción de anticuerpos anti-IP-10 neutralizantes dentro de las ratas, y estos autoanticuerpos de IP-10 pudieron transferir de forma adoptiva a resistencia a AA a ratas vírgenes (Salomon, I. y col. mencionado anteriormente).

15 En vista de lo anterior, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de artritis reumatoide administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes anti-AR tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), analgésicos, corticosteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), inhibidores de TNF (incluyendo adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) e infliximab (Rem-icade®)), fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (incluyendo metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, auranofina, azatioprina, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxyclorequina, leflunomida, minociclina, penicilamina y sulfasalazina), medicaciones para fibromialgia, medicaciones para osteoporosis y medicaciones para gota.

C. Enfermedad inflamatoria del intestino

25 La expresión de IP-10 ha mostrado que potencia significativamente en células que se infiltran en la lámina propia de biopsias colónicas tomadas de pacientes con colitis ulcerosa (Ugucconi, M. y col. (1999) Am. J. Pathol. 155:331-336). Además, se ha mostrado que la neutralización de IP-10 protege a los ratones de úlcera epitelial en colitis aguda y potencia la supervivencia de células de la cripta (Sasaki, S. y col. (2002) Eur. J. Immunol. 32:3197-3205). Además, en ratones IL-10 -/- que desarrollan colitis similar a enfermedad de Crohn en seres humanos, el tratamiento con anticuerpos anti-IP-10 condujo a mejora en la puntuación de inflamación (Singh, U.P. y col. (2003) J. Immunol. 171:1401-1406).

30 A la vista de lo anterior, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes anti-IBD, tales como fármacos que contienen mesalamina (incluyendo sulfasalacina y otros agentes que contienen ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), tales como olsalacina y balsalazida), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), analgésicos, corticosteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), inhibidores de TNF (incluyendo adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) e infliximab (Remicade®)), inmunosupresores (tales como 6-mercaptopurina, azatioprina y ciclosporina A), y antibióticos.

D. Lupus eritematoso sistémico

40 Los niveles de IP-10 en suero han mostrado que están notablemente aumentados en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE) y se ha mostrado que los niveles se correlacionan con actividad de la enfermedad (véase por ejemplo, Narumi, S. y col. (2000) Cytokine 12: 1561-1565). En consecuencia, en otra realización, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de SLE administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes anti-SLE, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), analgésicos, corticosteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), inmunosupresores (tales como ciclofosfamida, azatioprina, y metotrexato), fármacos anti-malaria (tales como hidroxyclorequina) y biológicos que inhiben la producción de anticuerpos de ADNbc (por ejemplo, LJP 394).

E. Diabetes de tipo I

50 Los niveles de IP-10 en suero ha mostrado que están elevados en pacientes con diabetes de Tipo I, particularmente los de enfermedad de aparición reciente y se ha mostrado que los niveles se correlacionan con el número de linfocitos T productores de interferón gamma sensibles a GAD en pacientes positivos para autoanticuerpos de GAD (Shimada, A. y col. (2001) Diabetes Care 24:510-515). En un estudio separado, se descubrió que los niveles de IP-10 en suero aumentaban en pacientes con enfermedad de nuevo diagnostico y en pacientes en alto riesgo de enfermedad, y las concentraciones de IP-10 se correlacionaban con niveles de IFN-gamma (Nicoletti, F. y col. (2002) Diabetologia 45:1107-1110). Además, se ha demostrado que las células beta secretan IP-10, lo que conduce a quimioatracción de linfocitos T, y se ha mostrado que los ratones deficientes en CXCR3 tienen aparición retardada de diabetes de tipo I (Frigerio, S. y col. (2002) Nature Medicine 8:1414-1420).

En consecuencia, en otra realización, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de diabetes de Tipo I administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes antidiabéticos, tales como insulina.

F. Trastornos inflamatorios de la piel

5 La expresión de IP-10 ha mostrado que está asociada con una diversidad de trastornos inflamatorios de la piel. Por ejemplo, se ha detectado IP-10 en queratinocitos y el infiltrado dérmico de placas psoriásicas activas (Gottlieb, A.B. y col. (1988) J. Exp. Med. 168:941-948). Además, CXCR3 se expresa por linfocitos CD3+ dérmicos, lo que sugiere que CXCR3 está implicado en el tráfico de linfocitos T a la dermis psoriásica (Rottman, J.B. y col. (2001) Lab. Invest. 81:335-347). En consecuencia, en otra realización, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el
10 tratamiento de psoriasis administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes o tratamientos, tales como tratamientos tópicos (por ejemplo, esteroides, alquitrán de hulla, calcipotrieno, tazaroteno, antralina, ácido salicílico), fototerapia, medicaciones sistémicas (por ejemplo, metotrexato, retinoides orales, ciclosporina, ésteres de ácido fumárico) y/o fármacos biológicos (por ejemplo, alefacept, efalizumab).

15 El liquen plano, una enfermedad inflamatoria crónica de la piel y la mucosa oral, ha mostrado que está asociada con linfocitos T CD4+ y CD8+ que se infiltran, que expresan CXCR3 y, además, se ha mostrado que los linfocitos T citolíticos que se infiltran CD8+ tienen IP-10 en sus gránulos citolíticos y se ha mostrado que los queratinocitos de lesión sobreexpresan IP-10 (Iijima, W. y col. (2003) Am. J. Pathol. 163:261-268). En consecuencia, en otra
20 realización, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de liquen plano administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes o tratamientos, tales como agentes antiinflamatorios, antihistamínicos, corticosteroides y terapia de luz.

Se ha mostrado que la expresión de IP-10 se eleva en otros trastornos inflamatorios de la piel, tales como lupus eritematoso discoide crónico e infiltración linfocítica de la piel de Jessner (Flier, J. y col. (2001) J. Pathol. 194:398-405). En consecuencia, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de estos
25 trastornos inflamatorios de la piel administrando un anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes o tratamientos, como se ha descrito anteriormente.

G. Enfermedad tiroidea autoinmune

Tanto IP-10 como CXCR3 han mostrado que se expresan en la glándula tiroides de pacientes que padecen enfermedad de Graves (GD), pero no que se expresan (o se expresan escasamente) en tejido tiroideo normal, y la
30 expresión fue más alta en pacientes con GD de aparición reciente (Romagnani, P. y col. (Am. J. Pathol. 161:195-206). También se ha mostrado que IP-10 se expresa en tejido tiroideo de pacientes que padecen tiroiditis de Hashimoto (Kemp, E.H. y col. (2003) Clin. Endocrinol. 59:207-213). En consecuencia, en otra realización, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedad tiroidea autoinmune, incluyendo enfermedad de Graves y tiroiditis de Hashimoto administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite
35 tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes o tratamientos, tales como fármacos antitiroideos, yodo radiactivo y tiroidectomía subtotal.

H. Síndrome de Sjogren

La expresión de ARNm de IP-10 ha mostrado que se regula positivamente de forma significativa en las glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjogren (SS), siendo más preeminente la expresión en el epitelio ductal
40 adyacente a los infiltrados linfoides (véase por ejemplo, Ogawa, N. y col. (2002) Arthritis Rheum. 46:2730-2741). En consecuencia, en otra realización, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de síndrome de Sjogren administrando un anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes anti-SS, tales como lubricantes artificiales (por ejemplo, lágrimas artificiales sin conservantes, salivas artificiales, lociones cutáneas sin aroma, pulverizaciones nasales salinas, y lubricantes
45 vaginales), Lacriserts® para tratamiento de ojos secos, clorhidrato de pilocarpina (Salagen®) y ceyimelina (Eyoxac®) para tratamiento de boca seca, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), esteroides y fármacos inmunosupresores.

I. Inflamación pulmonar

La expresión de IP-10 ha sido examinado en un modelo de ratón de asma alérgico, demostrando los resultados que
50 IP-10 se regula positivamente en los pulmones después de presentación de alérgenos y que la sobreexpresión de IP-10 se asociaba con aumento de la hiperactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, aumento de los niveles de IL-4 y reclutamiento de linfocitos CD8+ (Medoff, B.D. y col. (2002) J. Immunol. 168:5278-5286). Además, se ha mostrado que los fumadores que desarrollan enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) expresan IP-10 en su epitelio bronquiolar (Saetta, M. y col. (2002) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 165: 1404-1409). Además, se han
55 demostrado altos niveles de IP-10 en el fluido de lavado broncoalveolar de pacientes con sarcoidosis pulmonar y alveolitis linfocítica (Agostini, C. y col. (1998) J. Immunol. 161:6413-6420). En consecuencia, en otra realización, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedad caracterizada por inflamación pulmonar, tal como asma, EPOC, sarcoidosis pulmonar o alveolitis linfocítica, administrando el anticuerpo a un

sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes para reducir la inflamación pulmonar, tal como cromolina sódica, nedocromil sódico, corticosteroides inhalados, corticosteroides sistémicos (por ejemplo, orales), beta antagonistas de acción corta, broncodilatadores de acción corta, beta antagonistas o agonistas de acción larga (orales o inhalados), modificadores de leucotrieno, teofilina y terapia de oxígeno.

J. Rechazo de trasplantes

IP-10 ha mostrado que desempeña un papel en el rechazo de tejido trasplantado. Por ejemplo, el tratamiento de ratones con anticuerpos anti-IP-10 neutralizantes aumentó la supervivencia de aloinjertos de intestino delgado y redujo la acumulación de linfocitos T y linfocitos NK del huésped en la lámina propia (Zhang, Z. y col. (2002) J. Immunol. 168:3205-3212). Además, en ratones que reciben aloinjertos de islotes pancreáticos, el tratamiento con anticuerpo anti-IP-10 también dio como resultado aumento de la supervivencia del aloinjerto y reducción de la infiltración de injerto linfocítico (Baker, M.S. y col. (2003) Surgery 134:126-133). Adicionalmente, se demostró que los aloinjertos cardíacos, pero no corazones normales, expresaban IP-10 y CXCR3, y se asociaron niveles de IP-10 elevados con vasculopatía de aloinjerto cardíaco (Zhao, D.X. y col. (2002) J. Immunol. 169:1556-1560). También se ha mostrado que CXCR3 e IP-10 se expresan por células inflamatorias que se infiltran en aloinjertos de pulmón (Agostini, C. y col. (2001) Am J. Pathol. 158:1703-1711). Se mostró que la neutralización de CXCR3 o IP-10 *in vivo* atenúa el síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS), la principal limitación para la supervivencia para receptores de trasplantes de pulmón, en un modelo de trasplante de pulmón murino (Belperio, J.A. y col. (2002) J. Immunol. 169:1037-1049).

En vista de lo anterior, la invención también proporciona un procedimiento para inhibir rechazo de trasplante administrando un anticuerpo anti IP-10 de la invención a un receptor de trasplante que necesite tratamiento. Los ejemplos de trasplantes tisulares que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación, hígado, pulmón (por ejemplo, tratamiento de BOS), riñón, corazón, intestino delgado y células de islotes pancreáticos. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes para inhibir el rechazo de trasplante, tales como agentes inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, mofetil micofenolato, sirolimus, rapamicina, tacrolimus), agentes anti-infecciosos (por ejemplo, aciclovir, clotrimazol, ganciclovir, niestratina, trimetoprim-sulfametoxazol), diuréticos (por ejemplo, bumetanida, furosemida, metolazona) y medicaciones para úlcera (por ejemplo, cimetidina, famotidina, lansoprazol, omeprazol, ranitidina, sucralfato).

K. Lesión de la Médula espinal

La lesión traumática de la médula espinal conduce a infiltración de células inflamatorias. Se ha mostrado que IP-10 desempeña un papel central en la degeneración secundaria después de lesión de la médula espinal (González y col. (2003) Exp. Neurol. 184:456-463; véase también publicación de Patente de PCT WO 03/06045). Se ha mostrado que IP-10 está significativamente elevada en las medulas espinales de rata contusionadas 6 y 12 horas después de la lesión (McTigue, D.M. y col. (1998) J. Neurosci. Res. 53:368-376) y la médula espinal de ratones lesionados 6 horas después de la lesión (González y col. (2003) mencionado anteriormente). En consecuencia, se ha mostrado que la inhibición de la actividad de IP-10 después de lesión de la médula espinal es útil en la reducción de infiltración de células inflamatorias y de este modo en la reducción de daño tisular secundario a inflamación. La inhibición también puede reducir infiltración en células inflamatoria, reducir la degeneración secundaria y mejorar la recuperación después de lesión traumática del cerebro y apoplejía. Por lo tanto, la invención también proporciona un procedimiento para tratar lesión de la médula espinal y lesión cerebral (por ejemplo, apoplejía) en un sujeto que necesite tratamiento que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-IP-10 de la invención. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes, tales como otros agentes antiinflamatorios.

L. Enfermedades Neurodegenerativas

Se ha descubierto que la expresión de IP-10 y CXCR3 dentro del sistema nervioso central se regula positivamente en asociación con cambios patológicos asociados con enfermedad de Alzheimer (AD) (Xia, M.Q. y Hyman, D.T. (1999) J. Neurovirol. 5:32-41). Dentro de cerebros con AD, se mostró que CXCR3 se expresa constitutivamente en neuronas y procesos neuronales en diversas regiones corticales y subcorticales y se mostró que IP-10 se expresa en astrocitos y su nivel era notablemente elevado en comparación con cerebros normales (Xia, M.Q. y col. (2000) J. Neuroimmunol. 108:227-235). En consecuencia, los anticuerpos de la invención pueden usarse en tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, administrando a un sujeto que necesite tratamiento el anticuerpo anti-IP-10, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los ejemplos de agentes con los que puede combinarse el anticuerpo anti-IP-10 para tratamiento de enfermedad de Alzheimer incluyen inhibidores de colinesterasa (donepezilo, rivastigmina, galantamina, tacrina) y vitamina E. un ejemplo de un agente con el que puede combinarse el anticuerpo anti-IP-10 para tratamientos de enfermedad de Parkinson es levodopa.

M. Gingivitis

La periodontitis marginal se asocia con tejido de la encía inflamado. Se han descubierto células que producen IP-10 en tejido de la encía humana inflamado, así como células que expresan el receptor CXCR3 (Kabashima, H. y col.

(2002) Cytokine 20:70-77). En consecuencia, en otra realización, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de gingivitis administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes o tratamientos, tales como enjuagues bucales anti gingivitis (por ejemplo, enjuagues bucales antibióticos), raspado periodontal y alisado radicular y cirugía periodontal.

5 N. Inflamación asociada con terapia génica

Los adenovirus deficientes en replicación, usados como vectores adenovirales usados en terapia génica, pueden provocar lesión aguda e inflamación en tejidos infectados por los vectores virales. Se ha mostrado que tales vectores adenovirales inducen la expresión de IP-10 a través de activación dependiente de cápsida de NF κ B (Borgland, S.L. y col. (2000) J. Virol. 74:3941-3947). En consecuencia, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse para inhibir lesión inducida por IP-10 y/o inflamación durante tratamiento con terapia génica que utilice un vector viral, tal como un vector adenoviral, que estimula la producción no deseada de IP-10.

10 O. Enfermedades de Angiogénesis

IP-10 ha mostrado que inhibe la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* (Strieter y col. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 210:51-57; Angiolillo y col. (1995) J. Exp. Med. 182:155-162; Luster y col. (1995) J. Exp. Med. 182:219-231). La angiogénesis desempeña un papel crucial en muchos procesos de enfermedad, tales como la respuesta de curación a traumatismo. Por ejemplo, la vasculatura dentro de la médula espinal lesionada permanece en un estado de remodelación activa hasta al menos 28 días después de la lesión (Popovich y col. (1997) J. Comp. Neurol. 377:443-464).

Se cree que IP-10 ejerce sus efectos angiostáticos a través de la inhibición de crecimiento de células endoteliales y quimiotaxis. Hace esto a través de su motivo de unión a heparina, así como a través de un mecanismo mediado por receptor. A través de su motivo de unión a heparina evita que los factores angiogénicos FGF-2 y VEGF165 se unan a sus receptores. También ejerce sus efectos a través de un proceso mediado por receptor. El receptor para IP-10, CXCR3, se corta y empalma de forma alternativa para producir las dos variantes conocidas CXCR3A y CXCR3B. La unión de IP-10 con el receptor CXCR3A conduce a proliferación y quimiotaxis de la célula diana, mientras que la unión de IP-10 con el receptor CXCR3B tiene el efecto opuesto de inhibición del crecimiento y quimiotaxis. Es a través del receptor CXCR3B que actúa IP-10 como un factor angiostático (Lasagni y col. (2003) J. Exp. Med. 197:1537-1549).

En vista de lo anterior, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedades que requieren angiogénesis, por ejemplo cuando el comportamiento angiostático de IP-10 retarda o previene la curación y exacerba el proceso de enfermedad. Tales enfermedades incluyen: 1) neovascularización fisiológica aberrante, que puede tener un impacto en la curación de heridas, el ciclo del estro femenino, embarazo, hipertrofia inducida por ejercicio y similares; 2) indicaciones que pueden requerir estimulación de neovascularización, incluyendo inducción de formación de vasos colaterales (incluyendo isquemia miocárdica, isquemia periférica, isquemia cerebral), enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica, apoplejía, curación de heridas, injerto posterior a trasplante de órganos tal como trasplante de células de islotes, fractura y reparación de tendones, cirugía reconstructiva, ingeniería de tejidos, reestenosis, alopecia, úlceras por decúbito y estáticas, úlceras gastrointestinales, insuficiencia placentaria, necrosis aséptica, hipertensión pulmonar y sistémica, demencia vascular, enfermedad de Alzheimer, arteriopatía dominante autosómica cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); pseudoquiste tiroideo y linfedema; y 3) indicaciones que pueden requerir remodelación vascular, incluyendo malformaciones vasculares, psoriasis y pre-eclampsia. Los anticuerpos de la invención pueden usarse solos o en combinación con otros agentes inductores de angiogénesis.

30 P. Enfermedad inflamatoria de los riñones

Se ha notificado que el receptor CXCR3 se expresa en células mesangiales de pacientes con nefropatía de IgA, glomerulonefritis membranoproliferativa o glomerulonefritis de progresión rápida (Romagnani, P. y col. (1999) J. Am. Soc. Nephrol. 10:2518-2526). Además, en un modelo de ratón de nefritis nefrotóxica, se aumentaron los niveles de ARN de IP-10 seis veces en el córtex de riñones nefríticos 7 días después de la inducción de nefritis (Schadde, E. y col. (2000) Nephrol. Dial. Transplant. 15:1046-1053). Adicionalmente, se observaron altos niveles de expresión de IP-10 en muestras de ensayo de biopsia de riñón de pacientes humanos con glomerulonefritis en comparación con riñones normales (Romagnani, P. y col. (2002) J. Am. Soc. Nephrol. 13:53-64). En consecuencia, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedad inflamatoria de los riñones, incluyendo nefropatía de IgA, glomerulonefritis membranoproliferativa y glomerulonefritis de progresión rápida. Los anticuerpos de la invención pueden usarse solos o en combinación con otros agentes o tratamientos usados en el tratamiento de glomerulonefritis, tales como antibióticos, diuréticos, medicaciones para alta presión sanguínea y diálisis.

45 Q. Aterosclerosis

IP-10 ha mostrado que ser un factor mitógeno y quimiotáctico para músculo liso vascular, que son características importantes de células musculares lisas por su contribución a la patogenia de aterosclerosis (Wang, X. y col. (1996) J. Biol. Chem. 271:24286-24293). También se ha mostrado que IP-10 se induce en células de músculo liso después de tratamiento con LPS o interferón gamma, y también se indujo en la arteria carótida de ratas después de

angioplastia de globo (Wang, X. y col. (1996) mencionado anteriormente). Además, se ha demostrado que IP-10 se expresa en células endoteliales asociadas con ateroma, células de músculo liso y macrófagos, lo que sugiere un papel para IP-10 en el reclutamiento y retención de linfocitos T activados que se han observado dentro de lesiones de la pared vascular durante aterogénesis (Mach, F. y col. (1999) *J. Clin. Invest.* 104:1041-1050). En consecuencia, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento o prevención de aterosclerosis. Los anticuerpos pueden usarse solos o en combinación con otros agentes o tratamientos usados en el tratamiento de aterosclerosis, tales como medicaciones de alta presión sanguínea y fármacos reductores de colesterol.

R. Infecciones virales

IP-10 puede regularse positivamente en diversas infecciones virales y puede desempeñar un papel beneficioso en el reclutamiento de linfocitos T activados para luchar contra la infección viral. En ciertos casos, sin embargo, la producción de IP-10 durante infección viral puede conducir a efectos perjudiciales y, de este modo, la actividad de IP-10 puede ser no deseada y puede ser deseable inhibir la actividad de IP-10 en tales infecciones virales usando un anticuerpo anti-IP-10 de la invención.

Por ejemplo, IP-10 ha mostrado que estimula la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en macrófagos derivados de monocitos y linfocitos de sangre periférica (Lane, B.R. y col. (2003) *Virology* 307:122-134). Además, los niveles de IP-10 están elevados en líquido cefalorraquídeo y cerebro de pacientes infectados por VIH y en el sistema nervioso central de ratones transgénicos de VIH gp120 (Asensio, V.C. y col. (2001) *J. Virol.* 75:7067-7077).

También los niveles de IP-10 han mostrado que están elevados en pacientes con virus de hepatitis C persistente crónica (VHC) y en pacientes con hepatitis activa crónica (Narumi, S. y col. (1997) *J. Immunol.* 158:5536-5544). En hígados infectados por VHC, se mostró que IP-10 se expresaba por hepatocitos pero no por otros tipos celulares dentro del hígado, y se descubrió una proporción significativamente más alta de linfocitos T positivos para CXCR3 en el hígado en comparación con sangre (Harvey, C.E. y col. (2003) *J. Leukoc. Biol.* 74:360-369).

La secreción aumentada de IP-10 ha mostrado que está asociada con la respuesta inflamatoria a infección por virus de herpes simple de tipo I (VHS-1) ocular aguda en ratones, y se mostró que el tratamiento de ratones infectados por VHS-1 con anticuerpos anti-IP-10 reducían la infiltración de células mononucleares en el estroma de la cornea, reducía la patología de la cornea e inhibía la progresión del virus del estroma de la cornea a la retina durante infección aguda (Carr, D.J. y col. (2003) *J. Virol.* 77: 10037-10046).

También la expresión de IP-10 ha mostrado que se expresa en meningitis viral. Se demostró que IP-10 está presente en el CSF de pacientes con meningitis viral y que es responsable de la actividad quimiotáctica en neutrófilos, células mononucleares de sangre periférica y linfocitos T activados (Lahrtz, F. y col. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27:2484-2489; Lahrtz, F. y col. (1998) *J. Neuroimmunol.* 85:33-43).

En vista de lo anterior, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de infecciones virales que implican actividad de IP-10 no deseada administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. Los ejemplos no limitantes de infecciones virales que pueden tratarse incluyen VIH (por ejemplo, encefalitis inducida por VIH), VHC, VHS-1, meningitis viral y síndrome respiratorio agudo grave (SARS). El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes antivirales, tales como, para infección por VIH, inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos/nucleotídicos, inhibidores de transcriptasa inversa no nucleosídicos y/o inhibidores de proteasa (y combinaciones de los mismos, infección por VHC, interferón alfa 2a, interferón alfa 2a pegilado, y/o ribavirina, y para infección por VHS-1, aciclovir, valaciclovir y/o famciclovir.

S. Infecciones bacterianas.

Las infecciones bacterianas inducen producción de IP-10 en células afectadas (véase Gasper, N.A. y col. (2002) *Infect Immun.* 70: 4075-8). También se sabe específicamente que la meningitis bacteriana induce expresión de IP-10 (Lapinet, J.A. y col. (2000) *Infect Immun.* 68:6917-23). IP-10 también se produce por células somáticas testiculares de los túbulos seminíferos, en un modelo de infección bacteriana, lo que indica firmemente un papel probable de estas quimiocinas en la acumulación de neutrófilos y linfocitos T durante la inflamación testicular, que se observa clásicamente en la patogénesis de infecciones bacterianas (Aubry, F. y col. (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:690-8).

A la vista de lo anterior, los anticuerpos anti-IP-10 de la invención pueden usarse en el tratamiento de infecciones bacterianas que implican la actividad de IP-10 no deseada administrando el anticuerpo a un sujeto que necesite tratamiento. Los ejemplos de infecciones bacterianas incluyen, pero sin limitación, meningitis bacteriana y neumonía bacteriana. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes antibacterianos tales como antibióticos.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse como limitantes adicionales.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra IP-10Antígeno

Se usó como el antígeno IP10 humano recombinante purificado derivado de *E.coli* (PeptoTech, Inc., Cat número: 300-12), o IP10 humana recombinante purificada conjugada con hemocianina de lapa californiana (KLH).

5 Ratones HuMab y KM transgénicos

Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos para IP10 usando cepas HCo7, HCo12 y HCo17 de ratones transgénicos HuMab y la cepa KM de ratones transcromosómicos transgénicos, cada uno de los cuales expresa genes de anticuerpo humano. En cada una de estas cepas de ratón, el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno se ha roto de forma homocigota como se describe en Chen y col. (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen de cadena pesada de ratón endógeno se ha roto de forma homocigota como se describe en el Ejemplo 1 de la Publicación de PCT WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild y col. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. La cepa HCo7 porta el transgén de cadena pesada humana HCo7 como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. La cepa HCo12 porta el transgén de cadena pesada humano HCo12 como se describe en el Ejemplo 2 de la Publicación de PCT WO 01/09187. La cepa HCo17 porta el transgén de cadena pesada humano HCo17 como se describe en el Ejemplo 8 posterior. La cepa KM contiene el transcromosoma SC20 como se describe en la Publicación de PCT WO 02/43478.

Inmunizaciones de HuMab y KM:

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para IP10, se inmunizaron ratones HuMab y ratones KM con IP10 recombinante purificada derivada de *E.coli* o conjugado de TP10-KT.H_ como antígeno. Se describen esquemas de inmunización generales para ratones HuMab en Lonberg, N. y col (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. y col. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y Publicación de PCT WO 98/24884. Los ratones fueron de 6-16 semanas de edad tras la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación recombinante purificada (5-50 µg) de antígeno IP10 (por ejemplo, purificado de células de *E. coli* transfectadas que expresan IP-10) para inmunizar los ratones HuMab y ratones KM por vía intraperitoneal, por vía subcutánea (Sc) o mediante inyección en la almohadilla plantar.

Se inmunizaron ratones transgénicos dos veces con antígeno en adyuvante completo de Freund o adyuvante de Ribí por vía intraperitoneal (IP), por vía subcutánea (Sc) o mediante la almohadilla plantar (FP), seguido de inmunización IP, Sc o FP de 3-21 días (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund o Ribí. La respuesta inmune se supervisó por sangrados retroorbitales. El plasma se exploró mediante ELISA (como se describe posteriormente), y se usaron ratones con suficientes titulaciones de inmunoglobulina humana anti-IP-10 para fusiones. Los ratones se reforzaron por vía intravenosa con antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y retirada del bazo. Típicamente, se realizaron 10-35 fusiones para cada antígeno. Se inmunizaron varias docenas de ratones para cada antígeno. Se inmunizó un total de 82 ratones de las cepas de ratones HCo7, HCo12, HCo17 y KM con IP10.

Selección de ratones HuMab o KM que producen anticuerpos anti-IP-10:

Para seleccionar ratones HuMab o KM que producen anticuerpos que se unen a IP-10, se ensayó suero de ratones inmunizados por ELISA como se describe en Fishwild, D. y col. (1996). En resumen, se revistieron placas de microtitulación con IP10 recombinante purificada de *E. coli* a 1-2 µg /ml en PBS, 50 µl/pocillo incubados a 4 °C durante una noche y después bloqueados con 200 µl/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0,05%). Se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados con IP10 a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-Fc de IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano rústico. (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se revelaron con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron por espectrofotometría a OD 415-495. Los ratones que desarrollaron las titulaciones más altas de anticuerpos anti-IP10 se usaron para fusiones. Se realizaron fusiones como se describe posteriormente y se ensayaron sobrenadantes de hibridoma con respecto a actividad anti-IP10 por ELISA.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos para IP10:

Los esplenocitos de ratón, aislados de los ratones HuMab y ratones KM, se fusionaron con PEG en una línea celular de mieloma de ratón basándose en protocolos convencionales. Los hibridomas resultantes se exploraron después con respecto a la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Se fusionaron suspensiones de células sencillas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con un cuarto del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50% (Sigma). Las células se sembraron a aproximadamente 1×10^5 /pocillo en placa de microtitulación de fondo plano, seguido de incubación de aproximadamente dos semanas en medios selectivo que contiene suero bovino fetal al 10%, medio acondicionado P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) 10%, origen 3-5% (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alta glucosa, L-glutamina y piruvato sódico) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, gentamicina 50 mg/ml y HAT 1x (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2

semanas, las células se cultivaron en medio en el que se reemplazó HAT con HT. Se exploraron después pocillos individuales por ELISA (descrito anteriormente) con respecto a anticuerpos IgG monoclonales humanos anti-IP 10. Una vez que se produjo crecimiento de hibridoma extensivo, el medio se supervisó habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretaban anticuerpos se volvieron a sembrar en placas, se exploraron de nuevo y, si aún no eran positivos para IgG humano, se subclonaron anticuerpos monoclonales anti-IP10 al menos dos veces limitando la dilución. Los subclones estables se cultivaron después *in vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización adicional.

Se seleccionaron clones de hibridoma 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 y 13C4 para el análisis adicional.

10 Ejemplo 2: Caracterización estructural de anticuerpos monoclonales humanos frente a IP-10

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 y 13C4 se obtuvieron de los hibridomas correspondientes usando técnicas de PCR convencionales y se secuenciaron usando técnicas de secuenciación de ADN convencionales. En casos en los que la secuenciación de ADN por sí sola no fue suficiente para determinar de forma inequívoca la estructura del anticuerpo, también se realizó análisis proteico (por ejemplo, análisis de aminoácidos N-terminales y espectroscopia de masas) y los resultados se compararon con el análisis de secuencia de ADN para determinar de este modo la estructura de anticuerpo correcta. Los resultados del análisis estructural son como sigue:

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 1D4 se muestran en la Figura 1A y en SEC ID N°: 99 35, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 1D4 se muestran en la Figura 1B y en SEC ID N°: 110 y 84, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 1E1 se muestran en la Figura 2A y en SEC ID N°: 100 y 36, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 1E1 se muestran la Figura 2B y en SEC ID N°: 111 y 85, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2G1 se muestran en la Figura 3A y en SEC ID N°: 101 y 37, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2G1 se muestran en la Figura 3B y en SEC ID N°: 112 y 86, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 3C4 se muestran en la Figura 4A y en SEC ID N°: 102 y 38, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 3C4 se muestran en la Figura 4B y en SEC ID N°: 113 y 87, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 6A5 se muestran en la Figura 5A y en SEC ID N°: 103 y 39, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 6A5 se muestran en la Figura 5B y en SEC ID N°: 114 y 88, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 6A8 se muestran en la Figura 6A y en SEC ID N°: 104 y 40, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 6A8 se muestran en la Figura 6B y en SEC ID N°: 115 y 89, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 6B10 se muestran en la Figura 7A y en SEC ID N°: 105 y 41, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 6B 10 se muestran en la Figura 7B y en SEC ID N°: 116 y 90, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7C10 se muestran en la Figura 8A y en SEC ID N°: 106 y 42, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7C10 se muestran en la Figura 8B y en SEC ID N°: 117 y 91, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 8F6 se muestran en la Figura 9A y en SEC ID N°: 107 y 43, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 8F6 se muestran en la Figura 9B y en SEC ID N°: 118 y 92, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 10A12 se muestran en la Figura 10A y en SEC ID N°: 108 y 44, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 10A12 se muestran en la Figura 10B y en SEC ID N°: 119 y 93, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 13C4 se muestran en la Figura 11A y en SEC ID N°: 109 y 46, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 13C4 se muestran en la Figura 11B y en SEC ID N°: 120 y 94, respectivamente.

La comparación de las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 y 10A12 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que estas

5 cadenas pesadas de anticuerpo utilizan un segmento V_H de V_H 3-33 de línea germinal humana. El alineamiento de las secuencias V_H 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 y 10A12 con la secuencia V_H 3-33 de línea germinal (SEQ ID N°: 47) se muestra en la Figura 12. El análisis adicional de las secuencias V_H 1D4, 1E1, 2G1; 6A5, 6A8, 7C10 y 10A12 usando un sistema de Kabat de la determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 1A, 2A, 3A, 5A, 6A, 8A y 10A, respectivamente.

10 La comparación de las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada 6B10 y 8F6 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que estas cadenas pesadas de anticuerpo utilizan un segmento V_H de V_H 3-30.3 de línea germinal humana. El alineamiento de las secuencias V_H 6B10 y 8F6 con la secuencia V_H 3-33 de línea germinal (SEQ ID N°: 48) se muestra en la Figura 13. El análisis adicional de las secuencias V_H 6B10 y 8F6 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 7A y 9A, respectivamente.

15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 3C4 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que esta cadena pesada de anticuerpo utiliza un segmento V_H de V_H 5-51 de línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia V_H 3C4 con la secuencia V_H 5-51 de línea germinal (SEQ ID N°: 49) se muestra en la Figura 14. El análisis adicional de la secuencia V_H 3C4 usando el sistema de Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 4A.

20 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 13C4 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que esta cadena pesada de anticuerpo utiliza un segmento V_H de V_H 4-61 de línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia V_H 13C4 con la secuencia V_H 4-61 de línea germinal humana (SEQ ID N°: 50) se muestra en la Figura 15. El análisis adicional de la secuencia V_H 13C4 usando el sistema de Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 11A.

25 La comparación de las secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 y 13C4 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que estas cadenas ligeras de anticuerpo utilizan un segmento V_L de V_L A27 de línea germinal humana. El alineamiento de las secuencias V_L 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 y 13C4 con la secuencia V_L A27 de línea germinal (SEQ ID N°: 95) se muestra en la Figura 16. El análisis adicional de las secuencias V_L 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 y 13C4 usando el sistema de Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 1B, 3B, 5B, 6B, 10B y 11B, respectivamente.

30 La comparación de las secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera 1E1, 6B10 y 8F6 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que estas cadenas ligeras de anticuerpo utilizan un segmento V_L de V_L L6 de línea germinal humana. El alineamiento de las secuencias V_L 1E1, 6B10 y 8F6 con la secuencia V_L L6 de línea germinal (SEQ ID N°: 96) se muestra en la Figura 17. El análisis adicional de las secuencias V_L 1E1, 6B10 y 8F6 usando el sistema de Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 2B, 7B y 9B, respectivamente.

35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 3C4 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 3C4 utiliza un segmento V_L de V_L L18 de línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia V_L 3C4 con la secuencia V_L L18 de línea germinal (SEQ ID N°: 97) se muestra en la Figura 18. El análisis adicional de la secuencia V_L 3C4 usando un sistema de Kabat de determinación de región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 4B.

40 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 7C10 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 7C10 utiliza un segmento V_L de V_L L15 de línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia V_L 7C10 con la secuencia V_L L15 de línea germinal (SEQ ID N°: 98) se muestra en la Figura 19. El análisis adicional de la secuencia V_L 7C10 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 8B.

55 **Ejemplo 3: Caracterización de especificidad de unión y cinética de unión de anticuerpos monoclonales humanos IP-10**

En este ejemplo, se examinaron la afinidad de unión, cinética de unión y especificidad de unión de anticuerpos anti-IP-10 por análisis de Biacore. Además, se examinó la especificidad de unión y competición cruzada por ELISA.

Análisis de Biacore

Se caracterizaron anticuerpos Anti-IP-10 con respecto a afinidades y cinética de unión por análisis de Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se acopló IP-10 humano recombinante purificado expresado en *E. coli* (R & D

5 Systems) con la microplaca sensora CM5 @ 97 UR usando el protocolo de acoplamiento EDC/NHS proporcionado por Biacore AB. La unión se midió haciendo fluir el anticuerpo en tampón HBS EP (proporcionado por Biacore AB) a concentraciones de 33-267 nM a un caudal de 40 μ l/min. La cinética de asociación de antígeno-anticuerpo se siguió durante 5 minutos y la cinética de disociación se siguió durante 8 minutos. Las curvas de asociación y disociación se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando software BIAevaluation (Biacore AB). Solo se consideraron datos correspondientes a las primeras pocas docenas de segundos para fases de asociación y disociación para ajuste de curvas para minimizar el efecto de la avidéz. Los experimentos se realizaron tanto a 25 °C como a 37 °C. Los valores de K_D , K_{on} y K_{off} que se determinaron se muestran en la Tabla 1 para unión a 25 °C y en la Tabla 2 para unión a 37 °C:

Tabla 1: Caracterización de unión a 25 °C con IP-10 humana

Clon ID	Afinidad $K_D \times 10^{-9}$ (M)	Tasa de asociación $K_{on} \times 10^4$ (1/Ms)	Tasa de disociación $K_{off} \times 10^{-5}$ (1/s)
7C10	0,02	1,70	0,04
10A12	0,53	3,83	2,02
8F6	0,81	23,3	19,0
10A12S	0,88	3,68	3,24
6A5	1,20	3,11	3,64
6A5 Lote 2*	0,96	3,20	3,10
1D4	1,20	8,40	10,20
6B10	1,78	9,50	17,2
2G1	1,90	3,78	0,75

* 6A5 Lote 2 es una muestra independiente de anticuerpo purificado del sobrenadante de hibridoma6A5 en comparación con la muestra 6A5.

Tabla 2: Caracterización de unión a 37°C con IP-10 humana

Clon ID	Afinidad $K_D \times 10^{-9}$ (M)	Tasa de asociación $K_{on} \times 10^4$ (1/Ms)	Tasa de disociación $K_{off} \times 10^{-5}$ (1/s)
7C10	0,016	5,27	0,08
10A12	0,34	11,1	3,81
8F6	0,78	34,7	27,0
10A12S	0,49	9,10	4,43
6A5	0,70	10,2	7,15
6A5 Lote 2	0,74	8,41	6,26
1D4	1,15	16,6	19,2
6B10	2,54	19,9	50,4
2G1	0,34	14,8	4,97

10 Las medidas de los anticuerpos (en horas), como se define por el tiempo que tarda la disociación de la mitad del complejo anticuerpo-antígeno durante la fase de disociación, se midió a 25 °C y 37 °C. Los valores se determinaron por extensión de las curvas de disociación para llegar hasta el momento requerido para la reducción del 50% del eje Y del sensograma de disociación. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3: Semivida de anticuerpos a 25 °C y 37 °C

Clon ID	Semivida (en horas) a 25°C	Semivida (en horas) a 37°C
2G1	25,67	3,87
10A12	9,53	5,05
10A12S	5,94	4,34
6A5	5,29	2,69
6A5 Lote 2	6,21	3,87
1D4	1,88	1,00
6B10	1,12	0,38
8F6	1,01	0,71

La reactividad cruzada de los anticuerpos, a 25°C, con IP-10 de mono Rhesus, MIG humana, ITAC humano e IP-10 de ratón se determinó por análisis de Biacore usando los mismos procedimientos que se han descrito anteriormente para IP-10 humana. MIG humana, IP-10 humana e IP-10 de ratón se obtuvieron comercialmente (PeproTech, Rocky Hill, NJ), mientras que IP-10 de mono Rhesus se realizó por expresión recombinante y se purificó por procedimientos convencionales. Los antígenos se conjugaron con la microplaca sensora CM5 a 140 UR (IP-10 de mono rhesus), 457 UR (MIG humana), 206 UR (ITAC humano) y 150 UR (IP-10 de ratón). Se obtuvieron sensogramas de asociación haciendo fluir anticuerpos en tampón HBS EP a una concentración de 133 nM durante 5 minutos. El flujo se detuvo después y se supervisó la disociación durante 5 minutos. Las curvas de asociación y disociación se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir usando software BIAevaluation (Biacore AB). Los resultados de los experimentos de reactividad cruzada se resumen a continuación en la Tabla 4:

Tabla 4: Reactividad cruzada Anti-IP-10 con diversos ligandos de CXCR3

Clon ID	IP-10 de Rhesus $K_{Dx} \times 10^{-9}$ (M)	MIG humana $K_D \times 10^{-9}$ (M)	ITAC humana $K_D \times 10^{-9}$ (M)	IP-10 de ratón $K_D \times 10^{-9}$ (M)
7C10	4,4	105,0	Sin unión	464,0
10A12	0,71	161,0	Sin unión	Sin unión
8F6	0,81	Sin unión	Sin unión	Sin unión
10A12S	1,21	722,0	Sin unión	Sin unión
6A5	1,06	Sin unión	Sin unión	Sin unión
6A5 Lote 2	1,23	Sin unión	Sin unión	Sin unión
1D4	0,94	Sin unión	Sin unión	Sin unión
6B10	2,01	15,4	51,5	105,0
2G1	0,26	70,1	Sin unión	Sin unión

Análisis de ELISA

Se realizaron experimentos adicionales usando un ensayo de ELISA para examinar la reactividad cruzada antigénica de los anticuerpos anti-IP-10 con respecto a MIG humana, IP-10 de mono Rhesus o IP-10 de ratón. Los procedimientos usados para el ELISA fueron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 excepto que las placas de microtitulación se revistieron con 1 µg/ml de IP-10 humana recombinante, MIG humana (PeproTech, cat. N° 300-26), IP-10 de ratón (PeproTech, cat. N° 250-16) o IP-10 de mono rhesus recombinante. Los resultados, expresados como valores de EC_{50} (en ng/ml) se resumen a continuación en la Tabla 5:

Tabla 5: Reactividad cruzada Anti-IP-10 por ELISA con diversos ligandos de CXCR3

Clon ID	IP-10 humana (CE ₅₀ ng/ml)	IP-10 de mono (CE ₅₀ ng/ml)	MIG humana (CE ₅₀ ng/ml)	IP-10 de ratón
10A12	40	80	180	Sin unión
10A12S	4,9	15,6	380	Sin unión
2G1	30	30	45	Sin unión
6A5	35	90	Sin unión	Sin unión
6A5 Lote 2	62	125	Sin unión	Sin unión
6B10	30	45	20	Sin unión
8F6	90	31	Sin unión	Sin unión
1D4	25	62	Sin unión	Sin unión

También se realizaron estudios de competición cruzada entre los diversos anticuerpos anti-IP-10 mediante ELISA usando formas biotiniladas de 6A5 y 2G1 para determinar si los anticuerpos reconocen diferentes epítomos en IP-10. El procedimiento para ELISA de competición fue similar al ELISA descrito anteriormente en el Ejemplo 1. En resumen, la placas de microtitulación se revistieron con IP-10 recombinante purificada de *E. coli* a 0,2 µg/ml en PBS, 50 µl/pocillo y se incubaron a 4 °C durante una noche. Los pocillos se bloquearon después con 200 µl/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0,05%). Se añadieron diluciones de anticuerpos humanos purificados anti-IP-10 humana (de 2 µg/ml a 3,91 ng/ml) a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con 0,1 µg/ml de biotina-6A5 o biotina-2G1 durante 30 minutos. Las placas se lavaron después tres veces con PBS/Tween. Después de lavar, se añadió estreptavidina marcada con fosfatasa (KPL, Cat N° 15-30-00) a dilución 1:2000 en suero de pollo 5% a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se revelaron con sustrato p-NPP (Moss, Inc, lote 10274021) y se analizaron por espectrofotómetro DO 405. Como se esperaba, 2G1 no marcado pudo competir con biotina-2G1 por la unión con IP-10 y, además, 6A5, 7C10, 10A12, 10A12S, 6B10, 8F6 y 1D4 no marcados fueron cada uno capaces de competir con la unión de biotina-2G1 con IP-10 humana. De forma similar, 6A5 no marcado pudo competir con biotina-6A5 por la unión a IP-10 y, además, 2G1, 7C10, 10A12, 10A12S, 6B10, 8F6 y 1D4 no marcados fueron cada uno capaces de competir con la unión de biotina-6A5 con IP-10 humana. Estos resultados indican que cada uno de estos anticuerpos tiene una especificidad de unión para el mismo epítomo (o grupo de epítomos) de IP-10 humana.

20 Ejemplo 4: Inhibición de unión de IP-10 con CXCR3

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-IP-10 para inhibir la unión de IP-10 humana con su receptor CXCR3, en células que expresan receptor. En primer lugar, se realizó un análisis de Scatchard con respecto a unión de ¹²⁵I-IP-10 con células 300.19 transfectadas para expresar CXCR3. Las células se cultivaron en medio RPMI que contenía FCS al 10% y selección de G418. Antes de su uso, las células se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) a 4 °C y se ajustaron a 4 x 10⁷ células/ml. Se bloquearon placas de fibra de vidrio (Millipore MultiScreen®, Cat. N° MAFBNOB50) con 200 µl de una solución de polietilenoimina 0,1% un día antes del experimento. En el día del estudio, el tampón de bloqueo se aspiró usando un colector Millipore. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de unión (HEPES 50 mM, pH 7,2, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,5%). Se añadieron veinticinco microlitros de tampón de unión a cada pocillo seguido de 25 µl de IP-10 no marcado en exceso de 1.000 veces o tampón de unión. Se añadieron veinticinco µl de ¹²⁵I-IP-10 (Amersham, Cat. N° IM332-25 µmCi) a concentraciones crecientes, seguido de 25 µl de células a una densidad de 1 x 10⁶ células por pocillo. Las placas se incubaron en un agitador de placas durante 60 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con tampón de lavado (HEPES 10 mM, pH 7,2, NaCl 0,5 M, BSA 0,5%) a un volumen de 200 µl por lavado. Las placas se secaron, se añadieron 25 µl de agente de centelleo y las placas se contaron en un contador Microbeta Wallac. Los datos se analizaron usando software Prism y se calculó una K_D. Se determinó una K_D media de 0,231 nM para unión con el receptor.

A continuación, se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-IP-10 para inhibir la unión de ¹²⁵I-IP-10 100 pM con las células que expresaban CXCR3. Se ejecutaron ensayos de competición de una manera similar al experimento descrito anteriormente. En resumen, se añadieron 25 µl de tampón de unión a las placas de filtro de fibra de vidrio, seguido de 25 µl de concentraciones crecientes de anticuerpos anti-IP-10. Se añadieron veinticinco microlitros de ¹²⁵I-IP-10 a una concentración final de 0,100 nM. Finalmente, se añadieron 25 µl de células a una densidad de 1 x 10⁶ células por pocillo y las placas se incubaron en un agitador de placas durante 60 minutos a

temperatura ambiente, se lavaron y se contaron como se ha descrito anteriormente. Se calcularon los valores de CE_{50} usando software Prism. Los valores de K_i (en nM) se determinaron usando la fórmula:

$$K_i = \frac{CE_{50}}{1 + [I]/K_D}$$

5 Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 6:

Tabla 6: Inhibición de unión de IP-10 con CXCR3

Clon ID	K_i (nM)
10A12	0,09
10A12S	0,06
2G1	0,09
8F6	0,16
1E1	0,29
6B10	0,30
7C10	0,41
6A5	0,67
6A5 Lote 2	0,35
1D4	0,86

Ejemplo 5: Inhibición de flujo de calcio inducido por IP-10

En este ejemplo, la capacidad de anticuerpos anti-IP-10 para inhibir el flujo de calcio inducido por IP-10 se examinó usando células 300.19 transfectadas para expresar CXCR3 o linfocitos de sangre periférica humana activados anti-CD3 (PBL) que expresan CXCR3. Para preparar los PBL, se purificó sangre humana normal por separación de Ficoll convencional. Los PBL humanos purificados se estimularon añadiendo las células a placas revestidas con anticuerpo anti-CD3 3 $\mu\text{g/ml}$ y cultivadas en RPMI con FBS al 10%. Después de una incubación de tres días, las células se mantuvieron en medio de crecimiento que contenía IL-2 500 U/ml. El día del estudio, las células se lavaron y resuspendieron en medio a una densidad de $2,5 \times 10^7$ células/ml. Las células 300.19 transfectadas para expresar CXCR3 se dejaron crecer en RPMI que contenía FBS al 10%. Las células 300.19 se resuspendieron en medio de crecimiento a 2×10^6 células/ml.

Para realizar el ensayo, se añadieron 100 μl de suspensión celular a una placa de 96 pocillos de fondo claro y laterales negros que se revistió con Poli-D-Lisina (Corning/Costar, cat. N° 3667). Se añadieron 100 microlitros de colorante de carga de kit de calcio 3 (FlexStation™, Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA) a cada pocillo, las placas se centrifugaron a 1.100 RPM durante 4 minutos y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Usando una placa de reactivo de 96 pocillos, se diluyó IP-10 humana (Peprotech, cat. N° 300-12) en solución salina equilibrada de Hank con HEPES 20 mM y FBS a 1% (800 pM para células 300.19 y 1.200 pM para PBL humanos). Los anticuerpos se diluyeron en serie en las placas de reactivo que contenían IP-10. Se incluyeron pocillos de control que contenían tampón solamente o IP-10 solamente. Se añadieron veintidós microlitros de solución de IP-10/ anticuerpo por pocillo a las placas que contenían las células marcadas con colorante y se determinó el flujo de calcio supervisando la fluorescencia de Calcio 3 usando el instrumento FlexStation™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante, durante un periodo de tiempo de 200 segundos. El área bajo la curva (AUC) se calculó mediante la integración del flujo de calcio entre 20-100 segundos de acuerdo con protocolos convencionales (véase por ejemplo, Smart D. y col. (1999) Br. J. Pharmacol. 128:1-3). Los datos se analizaron usando software Prism™ (Molecular Devices, Inc.) y se determinaron los valores de CI_{50} (en nM). Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7: Inhibición de flujo de calcio inducido por EP-10

Clon ID	CI ₅₀ (nM) para HPBL	CI ₅₀ (nM) para células 300.19
10A12	1,25	0,18
10A12S	2,31	0,08
2G1	2,98	0,50
8F6	6,27	0,30
1E1	3,64	NT
6B10	4,40	0,50
7C10	8,15	0,77
6A5	2,85	0,61
6A5 Lote 2	2,18	0,42
1D4	4,07	0,34

Ejemplo 6: Inhibición de migración celular inducida por IP-10

- Se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-IP-10 para inhibir la migración celular inducida por IP-10 en un ensayo de quimiotaxis *in vitro*. En estos experimentos, se usaron células 300.19 que expresaban CXCR3 y se estimularon con (i) 100 ng/ml de IP-10 humana recombinante (rhIP-10); (ii) sobrenadante de células THP-1 estimuladas con IFN gamma (que induce secreción de IP-10 nativa y MIG), en el que IP-10 derivado de THP-1 estaba a una concentración de 16 ng/ml y la actividad de MIG se bloqueó mediante adición de anti-MIG (R&D Systems) a 2,5 µg/ml; o (iii) IP-10 de macaco rhesus recombinante 100 ng/ml (rrmIP-10). La inhibición de la migración celular se evaluó usando diversas concentraciones de anticuerpos y se determinó un índice quimiotáctico.
- 5
- 10 Específicamente, se evaluó la inhibición de quimiotaxis usando un ensayo de placa de 96 pocillos convencional (placas Multiscreen MIC (Millipore)). Se usó un filtro de 5 µm para líneas células transfectadas; y se usó filtro de 3 µm para células primarias. Se resuspendieron células sensibles (300.19 CXCR3+; células PBMC humanas específicas de MBP) en tampón de quimiotaxis (RPMI + BSA o FBS a 1%) a 1×10^6 células/ml. Se añadieron 100µl de suspensión celular al pocillo superior y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37 °C. Se aplicó CO₂ 5% antes de la adición al pocillo inferior.
- 15
- Se preparó IP-10 de macaco rhesus y humana a 100ng/ml; para IP-10 derivada de THP-1, las células THP-1 se estimularon con IFN-γ (0,2ng/ml) y se recogió el sobrenadante; se uso IP-10 derivada de MS CSF puro. Se preparó ligando en 150 µL de tampón de quimiotaxis y se situó en la cámara inferior.
- 20 Para ensayos de inhibición de quimiotaxis, se preincubó ligando con diversas concentraciones del anticuerpo anti-IP-10 indicado (5 µg/ml, 2.5 µg/ml, 1.25 µg/ml, 0,613 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,01 µg/ml) durante 30 minutos a 37 °C en CO₂ 5% antes de ensayar. La cámara superior se situó sobre los pocillos y los pocillos se incubaron durante 2 horas a 37 °C en CO₂ 5%. Al final de la incubación, las células sensibles se aspiraron desde la cámara superior. La cámara superior se retiró cuidadosamente. Las células se contaron en 4 campos aleatorios/pocillo a aumento 400x. Los datos se promediaron entre tres pocillos y se presentaron como un índice quimiotáctico (es decir la migración en veces en respuesta a ligandos sobre el medio solamente). Los resultados, expresados como valores de CI₅₀, se resumen a continuación en la Tabla 8:
- 25

Tabla 8: Inhibición de migración celular inducida por IP-10

Clon ID	CI ₅₀ de rhIP-10 (µg/ml)	CI ₅₀ de THP-1 IP-10 (µg/ml)	CI ₅₀ de rrmIP-10 (µg/ml)
6A5 (Lote 2)	0,156	0,132	0,119
8F6	0,355	0,173	0,100
6B10	1,1	0,193	0,149
10A12S	0,115	0,211	15,1
1D4	0,156	0,247	0,163

5 También se examinó la capacidad de anticuerpos anti-IP-10 para inhibir la migración de células 300.19 que expresan CXCR3 en respuesta a líquido cefalorraquídeo (CSF) de pacientes con esclerosis múltiple (EM). De nuevo, se añadió anticuerpo anti-MIG a 2,5 µg/ml a la muestra de CSF para neutralizar la actividad de MIG. Los resultados de los experimentos, expresados como valores de CI₅₀, se resumen a continuación en la Tabla 9:

Tabla 9: Inhibición de migración celular inducida por MS-CSF

Clon ID	CI ₅₀ del experimento 1 (µg/ml)	CI ₅₀ del experimento 2 (µg/ml)
6A5 (Lote 2)	0,100	0,236
10A12S	0,562	0,577

También se realizaron estudios de migración celular usando células 300.19 que expresaban CXCR3 y MIG humana recombinante (R&D Systems), a 200 ng/ml, para examinar la capacidad de los anticuerpos anti-IP-10 de inhibir la migración celular inducida por MIG. Los anticuerpos anti-IP-10 6B10, 8F6, 1D4, 6A5 lote 2, 10A12 y 10A12S se ensayaron individualmente a 1 µg/ml y se descubrió que no inhibían la migración celular inducida por MIG.

10 Ejemplo 7: unión de anticuerpos con la sección cerebral de pacientes con EM

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-IP-10 para tefir secciones del cerebro de un paciente con esclerosis múltiple (EM). Se obtuvieron secciones cerebrales de un paciente con EM mujer de 57 años de edad 19,8 horas post-mortem y mostraron una placa periventricular de forma irregular (1,3 cm x 1,0 cm) con numerosas placas más pequeñas adicionales presentes en toda la materia blanca restante. La tinción con LFB 15 mostró desmielinización completa. Se realizó inmunohistoquímica sobre las secciones usando los anticuerpos anti-IP-10 6A5 (lote 2) y 10A12S, así como anti-GFAP y anti-CD68, como controles positivos y un anticuerpo de control negativo.

Se empleó un protocolo de inmunohistoquímica convencional para tinción anti-IP-10 de las secciones. Las secciones se bloquearon usando suero 2%-10%. Se añadieron 100 µl/sección de anticuerpo primario (por ejemplo, 20 6A5) diluido 1:100 en suero 2%, después se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Opcionalmente, las secciones se incubaron durante una noche a 4 °C y se lavaron. Después se añadió el anticuerpo biotinilado antihumano secundario (diluido en suero 2% (100 µl/sección)) y se incubó durante 30-60 minutos a TA. Se retiraron peroxidasas endógenas añadiendo H₂O₂ diluido en MeOH. A continuación, se añadió solución ABC (Vector Labs), 100 µl/sección, y se incubó durante 30 minutos a TA. Se preparó solución de sustrato DAB inmediatamente antes de su uso. Se 25 aplicaron 100 µl por sección a portaobjetos antes de incubar en oscuridad durante 10-20 minutos (según fuera necesario para el revelado). Los portaobjetos se contratiñeron después con tinción nuclear de Hematoxilina durante 3 minutos (el progreso se comprobó después de 1 min). Finalmente los portaobjetos se incubaron en bicarbonato sódico 2% durante 45 segundos para sacar el color.

Los resultados mostraron que tanto 6A5 como 10A12S pueden unirse a IP-10 *in situ* en las secciones cerebrales del 30 paciente con EM, siendo más intensa la tinción de 6A5 que la tinción de 10A12S.

Ejemplo 8: Construcción de cepa HCo17 de ratones transgénicos

La cepa de ratón transgénico HCo17 se generó por inyección conjunta del inserto de 80 kb de pHC2 (Taylor y col. 35 (1994) Int. Immunol., 6: 579-591), el inserto de 25 Kb de pVX6, un fragmento de cromosoma artificial de levadura de aproximadamente 460 kb del cromosoma ylgH24. La construcción de pHC2 sola es completamente capaz de reordenarse *in vivo* para formar loci de inmunoglobulina de cadena pesada humana funcional; se añadieron pVX6 y ylgH24 para contribuir a la diversidad de V_H de línea germinal adicional. Los componentes individuales de la mezcla

de ADN usada para producir HCo17 se describen posteriormente.

El inserto de pH2 descrito anteriormente contiene cuatro segmentos génicos de V_H de línea germinal humana funcionales: 1-69 (DP-10), 5-51 (DP-73), 4-34 (DP-63), y 3-30.3 (DP-46). Además, esta construcción también contiene secuencias genómicas humanas que comprenden 15 segmentos D funcionales, los 6 segmentos J, así como segmentos de región constante μ y γ 1 y una región interruptor μ - γ 1 funcional.

El inserto de pVX6 contiene 3 segmentos VH de línea germinal humana, VH 1-18 (DP-14), VH5-51 (DP-73) y VH3-23 (DP-47). Se subclonó un fragmento de ADN HindIII/Sall de 8,5 kb, que comprendía el gen de VH1-18 (DP-14) humano de línea germinal, junto con aproximadamente 2,5 kb de secuencia genómica flanqueante 5' y 5 kb de flanqueante 3', en el vector plasmídico pSP72 (Promega, Madison, Wis.) para generar el plásmido p343.7.16. Se clonó un fragmento de ADN de 7 kb BamHI/HindIII, que comprendía el gen VH5-51 (DP-73) humano de línea germinal, junto con aproximadamente 5 kb de secuencia genómica flanqueante 5' y 1 kb de flanqueante 3', en el vector de clonación plasmídico basado en pBR322 pGP1f (Taylor y col. (1992) Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295), para generar el plásmido p251f. Se digirió un nuevo vector de clonación derivado de pGPIf, pGP1k, con EcoRV/BamHI, y se ligó a un fragmento de ADN EcoRV/BamHI de 10 kb, que comprendía el gen de VH3-23 (DP47) humano de línea germinal junto con aproximadamente 4 kb de secuencia genómica flanqueante 5' y 5 kb de genómica flanqueante 3'. El plásmido resultante, p112.2RR. 7, se digirió con BamHI/Sall y se ligó con el inserto de BamHI/Sall purificado de 7 kb de p251f. El plásmido resultante, pVx4, se digirió con XhoI y se ligó con el inserto de XhoI/Sall de 8,5 kb de p343.7.16. Se obtuvo un clon con el gen VH1-18 en la misma orientación que los otros dos genes V. Este clon, designado pVx6, se digirió después con NotI para la preparación de insertos.

El cromosoma artificial de levadura (YAC) ylgH24 se identificó originalmente por exploración por PCR usando cebador específico de la familia VH3 y VH4 y se mapea en el cromosoma humano 14 por contenido de VH. Se estableció que ylgH24 contiene segmentos VH incluyendo miembros de las familias de VH VH1, VH2, VH3, VH4 y VH5, y en particular al menos VH1-24, VH-45, VH1-46, VH2-26, VH3-30, V 3-30.5, VH3-30.3, VH3-33, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH4-28, VH4-30, VH4-30.4, VH4-30.3, VH4-31, VH4-34, 4-39, y VH-51.

Se combinaron insertos purificados de pVX6 (26 kb), pH2 (80 kb), y ylgH24 (~460 kb) en una relación molar 1:1:1 y se microinyectaron en los pronúcleos de embriones F2 de medio día (C57BL/6J x DBA/2J) como se describe en Hogan y col. (B. Hogan y col., Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 2ª edición, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.). Se estableció una línea fundadora de ratones transgénicos, que comprendía secuencias de pVx6, H2 y ylgH24, de ratones que se desarrollaban a partir de los embriones inyectados. Esta línea se designó (HCo17) 25950.

La línea (HCo17) 25950 se crió después con ratones que comprendían la mutación CMD (descrita en el Ejemplo 1 de la Publicación de PCT WO 01/09187), la mutación JKD (Chen y col. (1993) EMBO J. 12: 811-820), y el transgén (KCo5)9272 (Fishwild y col. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851). Los ratones resultantes expresan transgenes de cadena ligera kappa y pesada de inmunoglobulina humana en un fondo homocigoto para interrupción de los loci de cadena ligera kappa y pesada de ratón endógenos.

Sumario de la lista de secuencias

SEC ID N°:	SECUENCIA	SEC ID N°:	SECUENCIA
1	VH CDR1 a.a. 1D4	24	VH CDR3 a.a. 1D4
2	VH CDR1 a.a. 1E1	25	VH CDR3 a.a. 1E1
3	VH CDR1 a.a. 2G1	26	VH CDR3 a.a. 2G1
4	VH CDR1 a.a. 3C4	27	VH CDR3 a.a. 3C4
5	VH CDR1 a.a. 6A5	28	VH CDR3 a.a. 6A5
6	VH CDR1 a.a. 6A8	29	VH CDR3 a.a. 6A8
7	VH CDR1 a.a. 6B10	30	VH CDR3 a.a. 6B10
8	VH CDR1 a.a. 7C10	31	VH CDR3 a.a. 7C10
9	VH CDR1 a.a. 8F6	32	VH CDR3 a.a. 8F6
10	VH CDR1 a.a. 10A12	33	VH CDR3 a.a. 10A12
11	VH CDR1 a.a. 10A12S	34	VH CDR3 a.a. 13C4
12	VH CDR1 a.a. 13C4		

ES 2 388 435 T3

(continuación)

SEC ID N°:	SECUENCIA	SEC ID N°:	SECUENCIA
		35	VH a.a. 1D4
13	VH CDR2 a.a. 1D4	36	VH a.a. 1E1
14	VH CDR2 a.a. 1E1	37	VH a.a. 2G1
15	VH CDR2 a.a. 2G1	38	VH a.a. 3C4
16	VH CDR2 a.a. 3C4	39	VH a.a. 6A5
17	VH CDR2 a.a. 6A5	40	VH a.a. 6A8
18	VH CDR2 a.a. 6A8	41	VH a.a. 6B10
19	VH CDR2 a.a. 6B10	42	VH a.a. 7C10
20	VH CDR2 a.a. 7C10	43	VH a.a. 8F6
21	VH CDR2 a.a. 8F6	44	VH a.a. 10A12
22	VH CDR2 a.a. 10A12	45	VH a.a. 10A12S
23	VH CDR2 a.a. 13C4	46	VH a.a. 13C4
47	VH 3-33 línea germinal a.a.	49	VH 5-51 línea germinal a.a.
48	VH 3-30.3 línea germinal a.a.	50	VH 4-61 línea germinal a.a.
51	Vk CDR1 a.a. 1D4	73	Vk CDR3 a.a. 1D4
52	Vk CDR1 a.a. 1E1	74	Vk CDR3 a.a. 1E1
53	Vk CDR1 a.a. 2G1	75	Vk CDR3 a.a. 2G1
54	Vk CDR1 a.a. 3C4	76	Vk CDR3 a.a. 3C4
55	Vk CDR1 a.a. 6A5	77	Vk CDR3 a.a. 6A5
56	Vk CDR1 a.a. 6A8	78	Vk CDR3 a.a. 6A8
57	Vk CDR1 a.a. 6B10	79	Vk CDR3 a.a. 6B10
58	Vk CDR1 a.a. 7C10	80	Vk CDR3 a.a. 7C10
59	Vk CDR1 a.a. 8F6	81	Vk CDR3 a.a. 8F6
60	Vk CDR1 a.a. 10A12	82	Vk CDR3 a.a. 10A12
61	Vk CDR1 a.a. 13C4	83	Vk CDR3 a.a. 13C4
62	Vk CDR2 a.a. 1D4	84	Vk a.a. 1D4
63	Vk CDR2 a.a. 1E1	85	Vk a.a. 1E1
64	Vk CDR2 a.a. 2G1	86	Vk a.a. 2G1
65	Vk CDR2 a.a. 3C4	87	Vk a.a. 3C4
66	Vk CDR2 a.a. 6A5	88	Vk a.a. 6A5
67	Vk CDR2 a.a. 6A8	89	Vk a.a. 6A8
68	Vk CDR2 a.a. 6B10	90	Vk a.a. 6B10
69	Vk CDR2 a.a. 7C10	91	Vk a.a. 7C10
70	Vk CDR2 a.a. 8F6	92	Vk a.a. 8F6

(continuación)

SEC ID N°:	SECUENCIA	SEC ID N°:	SECUENCIA
71	Vk CDR2 a.a. 10A12	93	Vk a.a. 10A12
72	Vk CDR2 a.a. 13C4	94	Vk a.a. 13C4
95	Vk A27 línea germinal a.a.	97	Vk L18 línea germinal a.a.
96	Vk L6 línea germinal a.a.	98	Vk L15 línea germinal a.a.
99	VH n.t. 1D4	121	IP-10 humana a.a.
100	VH n.t. 1E1	122	CXCR3 humano a.a.
101	VH n.t. 2G1	123	IP-10 de mono rhesus a.a.
102	VH n.t. 3C4	124	IP-10 de ratón a.a.
103	VH n.t. 6A5	125	Mig humana a.a.
104	VH n.t. 6A8	126	ITAC humano a.a.
105	VH n.t. 6B10		
106	VH n.t. 7C10		
107	VH n.t. 8F6		
108	VH n.t. 10A12		
109	VH n.t. 13C4		
110	Vk n.t. 1D4		
111	Vk n.t. 1E1		
112	Vk n.t. 2G1		
113	Vk n.t. 3C4		
114	Vk n.t. 6A5		
115	Vk n.t. 6A8		
116	Vk n.t. 6B10		
117	Vk n.t. 7C10		
118	Vk n.t. 8F6		
119	Vk n.t. 10A12		
120	Vk n.t. 13C4		

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Medarex, Inc. et al.

5 <120> ANTICUERPOS DE IP-10 Y SUS USOS

<130> MXI-312PC

<150> 60/529180

<151> 10-12-2003

<160> 126

10 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

ES 2 388 435 T3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 1

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Tyr Gly Met His
1 5

<210> 3

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Cys Gly Met His
1 5

<210> 4

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

25 <210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Asn Gly Met His
1 5

30

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 388 435 T3

<400> 6

Thr Tyr Gly Met His
1 5

<210> 7

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asn Ser Ala Met His
1 5

<210> 8

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asn Ser Gly Met His
1 5

15 <210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Thr Tyr Gly Met His
1 5

20

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 10

Asn Cys Gly Met His
1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 11

Asn Ser Gly Met His
1 5

<210> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Ile Trp Phe Asp Gly Met Asn Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
Gly

5 <210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asp Tyr Ala Ala Ser Val Lys
 1 5 10 15
Gly

10

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 19

Leu Ile Pro Phe Asp Gly Tyr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
Gly

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 20

Val Ile Asp Tyr Asp Gly Ile Ile Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
Gly

<210> 21

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ile Ile Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
Gly

<210> 22

30 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Leu Ile Gly Phe Asp Gly Ile Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

5 <210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

10

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 24

Glu Gly Ala Gly Ser Ser Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 25

Asn Ile Ala Val Ala Asp Val Ala Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 26

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Trp Pro Glu Gly Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 27

30 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Pro Phe Phe Gln Tyr
 1 5 10

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 28

Glu Gly Asp Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Gly Asp Gly Ser Ser Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 30

15 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Gly Gly Tyr Thr Gly Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

20 <210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Arg Gly Thr His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Asp Tyr
 1 5 10

25 <210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 32

Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Trp Pro Glu Gly Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val
 1 5 10

5 <210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Gly Gly Thr Val Val Arg Gly Ile Ile His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Met Asp Val
 20

10

<210> 35

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 35

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

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 36

ES 2 388 435 T3

```

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

```

<210> 37

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 37

```

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

```

<210> 38

<211> 123

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

ES 2 388 435 T3

```

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

```

<210> 39

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 39

```

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

```

<210> 40

10 <211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

<210> 41

<211> 246

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 41

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asp Tyr Ala Ala Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Asp Gly Ser Ser Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gln Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser Ala Met His Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Pro
 165 170 175
 Phe Asp Gly Tyr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly
 210 215 220
 Gly Tyr Thr Gly Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 42

10 <211>123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

```

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

```

5 <210> 43

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

```

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

```

10

<210> 44

<211> 121

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 44

```

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

```

<210> 45

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 45

```

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

```

<210> 46

<211> 130

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

```

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

```

<210> 47

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 47

```

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

```

<210> 48

<211> 103

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

```

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Val Thr Val Ser Ser
          100

```

<210> 49

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 49

```

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

```

<210> 50

<211> 99

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
          20          25          30
Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          35          40          45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50          55          60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65          70          75          80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
          85          90          95
Cys Ala Arg

```

<210> 51

ES 2 388 435 T3

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Gly Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 58

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 59

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Val Ala
1 5 10

20 <210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

25 <210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 61

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

5 <210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 64

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 65

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 66

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 67

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

ES 2 388 435 T3

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 68

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 69

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 70

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

20 <210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

25 <210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 72

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 73

<211> 9

ES 2 388 435 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
 1 5

5 <210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
 1 5 10

10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 75

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Phe Thr
 1 5 10

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 76

Gln Gln Phe Asp Ser Phe Pro His Thr
 1 5

<210> 77

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Phe Thr
 1 5 10

<210> 78

30 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
 1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 79

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Tyr Thr
 1 5 10

<210> 80

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 81

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Gln Gln Arg Ser Asn Ser Pro Pro Trp Thr
 1 5 10

20 <210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Phe Thr
 1 5 10

25 <210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 83

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Glu Tyr Thr
 1 5 10

<210> 84

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

```

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

5 <210> 85

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

```

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

10

<210> 86

<211>109

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 86

```

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

```

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 87

```

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

```

<210> 88

<211> 109

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

```

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

```

<210> 89

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 89

```

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

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 90

```

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

<210> 91

<211> 107

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

```

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

```

<210> 92

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 92

```

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

```

<210> 93

<211> 109

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

```

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

```

<210> 94

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

```

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

```

<210> 95

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 95

```

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

```

<210> 96

<211> 95

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 96

ES 2 388 435 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

<210> 97

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 97

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

<210> 98

<211> 95

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

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

<210> 99

15 <211> 372

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 99

ES 2 388 435 T3

```

caggtgcagt tggtaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt cgcaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtttg aaggaagtat taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagagggt 300
gcggggagtt ctctctacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

```

<210> 100

<211> 360

<212>ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 100

```

caggagcagc tggtaggagtc tgggggaaac gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttagt acttatggca tgcactgggt cgcaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtga taaatactat 180
gcagactccg tgaaggaccg attcacggtc tccaaagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaatata 300
gcagtggctg acgttgcttt tgatctctgg ggcaggga caatggtcac cgtctcttca 360

```

<210> 101

<211> 363

10 <212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 101

```

caggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactgtggca tgcactgggt cgcaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atagggatg atggaattaa tgaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt tttactgtgc gagagactgg 300
cctgagggct actacaacgg catggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

```

<210> 102

15 <211> 369

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 102

```

gaggtgcagc tggtaggagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata caactttccc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatgggggtc atctctcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgtcct tccaaggcca agtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaggatat 300
tgtagtggtg gtagctgcta cccattcttc cagtactggg gccaggggcac cctggtcacc 360
gtctcctcc 369

```

20 <210> 103

<211> 372

<212>ADN

ES 2 388 435 T3

<213> Homo sapiens

<400> 103

```

caaatgcagc tggtaggagtc tgggggaggc gtgggccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtacag cgtctggatt caccttcagt aacaatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggttg atggaatgaa taaattctat 180
gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctggaatga acagcctgag agccgaggac acggctatat attactgtgc gagagaaggg 300
gatggttcgg ggatttatta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

```

<210> 104

5 <211> 372

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 104

```

cagggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc gtgggccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtacag cgtctggatt caccttcagt acctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatt atatggttc atggaagtaa tgaagattat 180
gcagcctccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggg 300
gatgggagct ccttatacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

```

10 <210> 105

<211> 366

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 105

```

cagggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc gtgggccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aactctgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt ataccatttg atggatacaa taaatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaaggt 300
ggatatactg gctacgatgg gggatttgac tattggggcc agggaatcct ggtcacccgc 360
tcctca 366

```

15

<210> 106

<211> 369

<212>ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 106

```

cagggtgcaac tggtaggagtc tgggggaggc gtgggccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactctggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atagactatg atggaattat tcaatactat 180
gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaataaa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gacagagagg 300
ggcacgcatt actatggttc ggggagtttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca 369

```

ES 2 388 435 T3

<210> 107

<211> 360

<212>ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 107

```

caggtgcaac tggaggactc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaat acctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaatcat taaacactac 180
gccgactccg tgaagggccg attcaccata accagagaca attccaagaa catgggtgcat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagc 300
agcagctggg acgtctactt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

```

<210> 108

<211> 363

<212>ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 108

```

caggtgcagc tggaggagt c tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactgtggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atagggtttg atggaattaa tgaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagactgg 300
cctgagggct actacaacgg catggacgtc tggggccaag ggaccacggg caccgtctcc 360
tca 363

```

<210> 109

<211> 390

15 <212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 109

```

caggtgcagc tgcaggagt c gggcccagga ctgggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcacta tctctgggtg ctccgtcagc agtgggtgatt actactggag ctggatccgg 120
cagcccccag ggaagggact ggagtggatt ggggaacatct attacagtgg gagcaccaac 180
tacaaccctt ccctcaagag tcgagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccttgaagc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagaggg 300
gggggtactg tggttcgggg aattatccat tactactact actacgggat ggacgtctgg 360
ggccaagggg ccacgggtcac cgtctcctca 390

```

<210> 110

20 <211> 324

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 110

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcggacact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
ggcaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaa 324

```

<210> 111

<211> 324

<212>ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 111

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccatc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcattccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctggagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccact cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324

```

<210> 112

<211> 324

10 <212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 112

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccatc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcattccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctggagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccact cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324

```

<210> 113

15 <211> 321

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 113

```

gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcg gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gectccagtt tggaaagtgg ggtcccataca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttgatagtt tccctcacac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

```

20 <210> 114

<211> 327

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 114

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagctatt tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatocca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctat attcactttc 300
ggcctggga ccaaagtgga tatcaaa 327

```

<210> 115

<211> 321

5 <212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 115

```

gaagttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcggctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatocca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacccac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

```

<210> 116

10 <211> 324

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 116

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcaetctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaa 324

```

15 <210> 117

<211> 321

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 117

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120
gagaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaetctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcccac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

```

20

<210> 118

<211> 324

<212>ADN

ES 2 388 435 T3

<213> Homo sapiens

<400> 118

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacgtag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccacagcag cctagagcct 240
gaagattttg caatttatta ctgtcagcag cgtagcaact cgcctccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324
    
```

<210> 119

5 <211> 327

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 119

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcc attcactttc 300
ggccctggga ccaaagtggg tatcaaa 327
    
```

10 <210> 120

<211> 654

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 120

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcc attcactttc 300
ggccctggga ccaaagtggg tatcaaaaga attgtgttga cgcagtctcc aggcaccctg 360
tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tctctgcaggg ccagtcagag tgtagcagc 420
agctacttag cctggtacca gcagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatggt 480
gcacccagca gggccactgg catcccagac aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac 540
ttcactctca ccacagcag actggagcct gaagattttg cagtgtatta ctgtcagcag 600
tatggtagct caccggagta cacttttggc caggggacca agctggagat caaa 654
    
```

15

<210> 121

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 121

```

Met Asn Gln Thr Ala Ile Leu Ile Cys Cys Leu Ile Phe Leu Thr Leu
 1          5          10          15
Ser Gly Ile Gln Gly Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys
          20          25          30
Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu
          35          40          45
    
```

ES 2 388 435 T3

Glu Ile Ile Pro Ala Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala
50 55 60
Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys
65 70 75 80
Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Met Ser Lys Arg
85 90 95
Ser Pro

<210> 122

<211> 368

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 122

Met	Val	Leu	Glu	Val	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Ala	Glu	Val
1				5					10					15	
Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	Asn	Phe	Ser	Ser	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Glu	Asn
			20					25					30		
Glu	Ser	Asp	Ser	Cys	Cys	Thr	Ser	Pro	Pro	Cys	Pro	Gln	Asp	Phe	Ser
		35					40					45			
Leu	Asn	Phe	Asp	Arg	Ala	Phe	Leu	Pro	Ala	Leu	Tyr	Ser	Leu	Leu	Phe
	50					55					60				
Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Asn	Gly	Ala	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Leu	Ser
65					70					75					80
Arg	Arg	Thr	Ala	Leu	Ser	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Leu	Leu	His	Leu	Ala
				85					90					95	
Val	Ala	Asp	Thr	Leu	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Pro	Leu	Trp	Ala	Val	Asp
			100					105					110		
Ala	Ala	Val	Gln	Trp	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Leu	Cys	Lys	Val	Ala	Gly
		115					120					125			
Ala	Leu	Phe	Asn	Ile	Asn	Phe	Tyr	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Cys
	130					135					140				
Ile	Ser	Phe	Asp	Arg	Tyr	Leu	Asn	Ile	Val	His	Ala	Thr	Gln	Leu	Tyr
145					150					155					160
Arg	Arg	Gly	Pro	Pro	Ala	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Ala	Val	Trp
				165					170					175	
Gly	Leu	Cys	Leu	Leu	Phe	Ala	Leu	Pro	Asp	Phe	Ile	Phe	Leu	Ser	Ala
			180					185					190		
His	His	Asp	Glu	Arg	Leu	Asn	Ala	Thr	His	Cys	Gln	Tyr	Asn	Phe	Pro
		195					200					205			
Gln	Val	Gly	Arg	Thr	Ala	Leu	Arg	Val	Leu	Gln	Leu	Val	Ala	Gly	Phe
	210					215					220				
Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Met	Ala	Tyr	Cys	Tyr	Ala	His	Ile	Leu	Ala
225					230					235					240
Val	Leu	Leu	Val	Ser	Arg	Gly	Gln	Arg	Arg	Leu	Arg	Ala	Met	Arg	Leu
				245					250					255	
Val	Val	Val	Val	Val	Val	Ala	Phe	Ala	Leu	Cys	Trp	Thr	Pro	Tyr	His
			260					265					270		
Leu	Val	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Leu	Met	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Arg
		275					280					285			
Asn	Cys	Gly	Arg	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Val	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Ser
	290					295					300				
Gly	Leu	Gly	Tyr	Met	His	Cys	Cys	Leu	Asn	Pro	Leu	Leu	Tyr	Ala	Phe
305					310					315					320
Val	Gly	Val	Lys	Phe	Arg	Glu	Arg	Met	Trp	Met	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu
			325						330					335	
Gly	Cys	Pro	Asn	Gln	Arg	Gly	Leu	Gln	Arg	Gln	Pro	Ser	Ser	Ser	Arg
			340					345						350	
Arg	Asp	Ser	Ser	Trp	Ser	Glu	Thr	Ser	Glu	Ala	Ser	Tyr	Ser	Gly	Leu
		355						360					365		

<210> 123

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 123

Met Asn Gln Thr Ala Ile Leu Ile Cys Cys Leu Val Phe Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Gly Ile Gln Gly Ile Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys
 20 25 30
 Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu
 35 40 45
 Glu Ile Ile Pro Pro Ser Gln Phe Cys Pro His Val Glu Ile Ile Ala
 50 55 60
 Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys
 65 70 75 80
 Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg
 85 90 95
 Ser Pro

<210> 124

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 124

Met Asn Pro Ser Ala Ala Val Ile Phe Cys Leu Ile Leu Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Ser Gly Thr Gln Gly Ile Pro Leu Ala Arg Thr Val Arg Cys Asn Cys
 20 25 30
 Ile His Ile Asp Asp Gly Pro Val Arg Met Arg Ala Ile Gly Lys Leu
 35 40 45
 Glu Ile Ile Pro Ala Ser Leu Ser Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala
 50 55 60
 Thr Met Lys Lys Asn Asp Glu Gln Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys
 65 70 75 80
 Thr Ile Lys Asn Leu Met Lys Ala Phe Ser Gln Lys Arg Ser Lys Arg
 85 90 95
 Ala Pro

<210> 125

<211> 125

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

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

ES 2 388 435 T3

<210> 126

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 126

```

Met Ser Val Lys Gly Met Ala Ile Ala Leu Ala Val Ile Leu Cys Ala
 1          5          10          15
Thr Val Val Gln Gly Phe Pro Met Phe Lys Arg Gly Arg Cys Leu Cys
 20          25          30
Ile Gly Pro Gly Val Lys Ala Val Lys Val Ala Asp Ile Glu Lys Ala
 35          40          45
Ser Ile Met Tyr Pro Ser Asn Asn Cys Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile
 50          55          60
Thr Leu Lys Glu Asn Lys Gly Gln Arg Cys Leu Asn Pro Lys Ser Lys
 65          70          75          80
Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe
 85          90
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, comprendiendo dicho anticuerpo:
 - 5 (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 92;
 - (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 84; o
 - (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 39 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 88.
- 10 2. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 92.
- 15 3. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 84.
4. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 39 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 88.
- 20 5. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 unido con un agente terapéutico.
6. El inmunoconjugado de la reivindicación 5, en el que el agente terapéutico es una citotoxina o isótopo radiactivo.
7. Una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, unido con un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente de dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno.
- 25 8. Una composición que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el inmunoconjugado de la reivindicación 5 o 6 o molécula biespecífica de la reivindicación 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o parte de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 10. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.
11. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 10.
12. Un ratón transgénico que comprende transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana, en el que el ratón expresa el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 13. Un hibridoma preparado a partir del ratón de la reivindicación 12, en el que el hibridoma produce dicho anticuerpo.

FIGURA 1A

VH 1D4 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
-----
55  R L S C A A S G F T P S S Y G M H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
-----
109 V R Q A P G K G L E W V A V I W F E
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TTT GAA

                                CDR2
-----
163 G S I K Y Y A D S V K G R P T I S R
    GGA AGT ATT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAT ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
-----
271 T A V Y Y C A R E G A G S S L Y Y Y
    ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGA GAG GGT GCG GGG AGT TCT CTC TAC TAC TAC

                                CDR3
-----
325 Y G M D V W G Q G T T V T V S S
    TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 1B

VK 1D4 anti-IP10

segmento V: **A27**

segmento J: **JK2**

```

1   E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
   GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
-----
55  A T L S C R A S Q S V S S G H L A W
   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC GGA CAC TTA GCC TGG

                                CDR2
-----
109 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
    TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

    CDR2
    -----
163 R A T G I P G R F S G S G S G T D F
    AGG GCC ACT GGC ATC CCA GGC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

    T L T I S R L E P E D P A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                                CDR3
    -----
271 Q Y G S S P Y T F G Q G T K L E I K
    CAG TAT GGT AGC TCA CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

FIGURA 2A

VH 1E1 anti-IP10

segmento V: **VH3-33**
 segmento D: indeterminado
 segmento J: **JH3a**

```

1   Q E Q L V E S G G N V V Q P G R S L
    CAG GAG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA AAC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
-----
55  R L S C A A S G P T P S T Y G M H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTT AGT ACT TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
-----
109 V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
-----
163 G S D K Y Y A D S V K D R F T V S K
    GGA AGT GAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GAC CGA TTC ACG GTC TCC AAA

                                CDR2
-----
217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
-----
271 T A V Y Y C A R N I A V A D V A F D
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA AAT ATA GCA GTG GCT GAC GTT GCT TTT GAT

                                CDR3
-----
325 L W G Q G T M V T V S S
    CTC TGG GGC CAG GCG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
    
```

↓
→

FIGURA 2B

VK 1E1 anti-IP10

segmento V: L6
 segmento J: JK4

```

1   E I V L T Q S P A I L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ATC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55  A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
    CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

    CDR2
    -----
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
    GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

    CDR3
    -----
271 R S N W P P L T F G G G T K V E I K
    CGT AGC AAC TGG CCT CCA CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 3A

VH 2G1 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
55  R L S C A A S G F T F S N C G M H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TGT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q A P G K G L E W V A L I G Y D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA GGG TAT GAT

                                CDR2
                                -----
163 G I N E Y Y A D S V K G R F T I S R
    GGA ATT AAT GAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A V F Y C A R D W P E G Y Y N G N
    ACG GCT GTG TTT TAC TGT GCG AGA GAC TGG CCT GAG GGC TAC TAC AAC GGC ATG

                                CDR3
                                -----
325 D V W G Q G T T V T V S S
    GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 3B

VK 2G1 anti-IP10

segmento V: **A27**

segmento J: **JK3**

```

1   E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
-----
55  A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
-----
109 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
    TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

    CDR2
-----
163 R A T G I P D R F S G S G S G T D F
    AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
-----
217 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
    ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

    CDR3
-----
271 Q Y G S S P P F T F G P G T K V D I
    CAG TAT GGT AGC TCA CCT CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC

325 K
    AAA
    
```

FIGURA 4A

VH 3C4 anti-IP10

segmento V: 5-51
 segmento D: D2-15
 segmento J: JH1

```

1   B V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
    GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                -----
55  K I S C K G S G Y N F P S Y W I G W
    AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AAC TTT CCC AGC TAC TGG ATC GGC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q M P G K G L E W M G V I S P G
    GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG GTC ATC TCT CCT GGT

                                CDR2
                                -----
163 D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
    GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAA GTC ACC ATC TCA GCC

217 D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D
    GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A M Y Y C A R G Y C S G G S C Y P
    ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA GGA TAT TGT AGT GGT GGT AGC TGC TAC CCA

                                CDR3
                                -----
325 F F Q Y W G Q G T L V T V S S
    TTC TTC CAG TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCC
    
```

FIGURA 4B

VK 3C4 anti-IP10

segmento V: L18
segmento J: JK4

```

1   A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
    GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
-----
55  V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
    GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
-----
109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
    CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

    CDR2
-----
163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T
    GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
-----
217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

    CDR3
-----
271 F D S F P H T F G G G T K V E I K
    TTT GAT AGT TTC CCT CAC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 5A

VH 6A5 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH6b

```

1   Q M Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAA ATG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
-----
55  R L S C T A S G P T F S N N G M H W
    AGA CTC TCC TGT ACA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC AAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
-----
109 V R Q A P G K G L E W V A V I W F D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TTT GAT

                                CDR2
-----
163 G M N K F Y V D S V K G R F T I S R
    GGA ATG AAT AAA TTC TAT GTA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L E M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG GAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
-----
271 T A I Y Y C A R E G D G S G I Y Y Y
    ACG GCT ATA TAT TAC TGT GCG AGA GAA GGG GAT GGT TCG GGG ATT TAT TAC TAC

                                CDR3
-----
325 Y G M D V W G Q G T T V T V S S
    TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 5B

VK 6A5 anti-IP10

segmento V: **A27**
 segmento J: **JK3**

```

1      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55     A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAT TTA GCC TGG

                                CDR2
                                -----
109    Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
      TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      -----
163    R A T G I P D R F S G S G S G T D F
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                CDR 3
                                                                ----
217    T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
      ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      -----
271    Q Y G S S P I F T F G P G T K V D I
      CAG TAT GGT AGC TCA CCT ATA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC

325    K
      AAA
    
```

FIGURA 6A

VH 6A8 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
55  R L S C T A S G F T F S T Y G M H W
    AGA CTC TCC TGT ACA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q A P G K G L E W V A I I W F D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA ATT ATA TGG TTC GAT

                                CDR2
                                -----
163 G S N E D Y A A S V K G R F T I S R
    GGA AGT AAT GAA GAT TAT GCA GCC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC ACC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A V Y Y C A R E G D G S S L Y Y Y
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GGG GAT GGG AGC TCC TTA TAC TAC TAC

                                CDR3
                                -----
325 Y G M D V W G Q G T T V T V S S
    TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 6B

VK 6A8 anti-IP10

segmento V: A27
 segmento J: JK4

```

1   E V V L T Q S P G T L S L S P G E R
    GAA GTT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55  A T L S C R A S Q S I S S G Y L A W
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC GGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
                                -----
109 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
    TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

    CDR2
    -----
163 R A T G I P D R P S G S G S G T D F
    AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

    CDR3
    -----
217 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
    ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

    CDR3
    -----
271 Q Y G S S P T F G G G T K V E I K
    CAG TAT GGT AGC TCA CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 7A

VH 6B10 anti-IP10

segmento V: 3-30.3
 segmento D: 5-12
 segmento J: JH4b

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
 1 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

 CDR1

 R L S C A A S G F T P S N S A M H W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TCT GCT ATG CAC TGG

 CDR2

 V R Q A P G K G L E W V A L I P P D
 109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA CCA TTT GAT

 CDR2

 G Y N K Y Y A D S V K G R F T I S R
 163 GGA TAC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
 217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

 CDR3

 T A V Y Y C A R E G G Y T G Y D G G
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGC GCG AGA GAA GGT GGA TAT ACT GGC TAC GAT GGG GGA

 CDR3

 F D Y W G Q G I L V T V S S
 325 TTT GAC TAT TGG GGC CAG GGA ATC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIGURA 7B

VK 6B10 anti-IP10

segmento V: L6
segmento J: JK2

```

1   E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55  A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
    CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

    CDR2
    -----
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
    GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

    CDR3
    -----
271 R S N W P P Y T P G Q G T K L E I K
    CGT AGC AAC TGG CCT CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 8A

VH 7C10 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH4b

```

1      Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
      CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG
                                     CDR1
55     R L S C A A S G F T F S N S G M H W
      AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TCT GGC ATG CAC TGG
                                     CDR2
109    V R Q A P G K G L E W V A V I D Y D
      GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA GAC TAT GAT
      CDR2
163    G I I Q Y Y A D S V K G R P T I S R
      GGA ATT ATT CAA TAC TAT GCC GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
217    D N S K N T L Y L Q I N S L R A E D
      GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATA AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC
                                     CDR3
271    T A V Y Y C A T E R G T H Y Y G S G
      ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACA GAG AGG GGC ACG CAT TAC TAT GGT TCG GGG
      CDR3
325    S F D Y W G Q G T L V T V S S
      AGT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 8B

VK 7C10 anti-IP10

segmento V: L15
segmento J: JK4

```

1   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
-----
55  V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
    GTC ACC ATC ACT TGT CCG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
-----
109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
    CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

    CDR2
-----
163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
    CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
-----
217 L T I S S L Q P E D P A T Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

    CDR3
-----
271 Y N S Y P P T F G G G T K V E I K
    TAT AAT AGT TAC CCT CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 9A

VH 8F6 anti-IP10

segmento V: 3-30.3
 segmento D: 6-13
 segmento J: JH4b

Q V Q L V D S G G G V V Q P G R S L
 1 CAG GTG CAA CTG GTG GAC TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

CDR1

R L S C A A S G P T P N T Y G M H W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AAT ACC TAT GGC ATG CAC TGG

CDR2

V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D
 109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

CDR2

G I I K H Y A D S V K G R F T I T R
 163 GGA ATC ATT AAA CAC TAC GCC GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATA ACC AGA

D N S K N M V H L Q M N S L R A E D
 217 GAC AAT TCC AAG AAC ATG GTG CAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

CDR3

T A V Y Y C A R D S S S W Y V Y F D
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT AGC AGC AGC TGG TAC GTC TAC TTT GAC

CDR3

Y W G Q G T L V T V S S
 325 TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIGURA 9B

VK 8F6 anti-IP10

segmento V: L6
segmento J: JK1

```

1   E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
-----
55  A T L S C R A S Q S V S S Y V A W Y
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC GTA GCC TGG TAC

                                CDR2
-----
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
     CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

    CDR2
-----
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
     GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
-----
217 L T I S S L E P E D F A I Y Y C Q Q
     CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA ATT TAT TAC TGT CAG CAG

    CDR3
-----
271 R S N S P P W T F G Q G T K V E I K
     CGT AGC AAC TCG CCT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
    
```

FIGURA 10A

VH 10A12 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
55  R L S C A A S G F T F S N C G M H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TGT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q A P G K G L E W V A L I G F D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA GGG TTT GAT

                                CDR2
                                -----
163 G I N E Y Y A D S V K G R F T I S R
    GGA ATT AAT GAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A V Y Y C A R D W P E G Y Y N G M
    ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGA GAC TGG CCT GAG GGC TAC TAC AAC GGC ATG

                                CDR3
                                -----
325 D V W G Q G T T V T V S S
    GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 10B

VK 10A12 anti-IP10

segmento V: A27
segmento J: JK3

```

1   E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55  A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                                CDR2
                                                -----
109 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
    TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

    CDR2
    -----
163 R A T G I P D R F S G S G S G T D F
    AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

    CDR3
    -----
217 T L T I S R L E P E D P A V Y Y C Q
    ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

    CDR3
    -----
271 Q Y G S S P P F T F G P G T K V D I
    CAG TAT GGT AGC TCA CCT CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC

325 K
    AAA

```

FIGURA 11A

VH 13C4 anti-IP10

segmento V: 4-61
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L
    CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
55  S L T C T I S G G S V S S G D Y Y W
    TCC CTC ACC TGC ACT ATC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GGT GAT TAC TAC TGG

    CDR1                                CDR2
    ---                                -----
109 S W I R Q P P G K G L E W I G N I Y
    AGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG AAC ATC TAT

                                CDR2
                                -----
163 Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S
    TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAC GCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCG

217 V D T S K N Q F S L K L S S V T A A
    GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCT GCG

                                CDR3
                                -----
271 D T A V Y Y C A R G G G T V V R G I
    GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGG GGT ACT GTG GTT CCG GGA ATT

                                CDR3
                                -----
325 I H Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V
    ATC CAT TAC TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC

379 T V S S
    ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 11B

VK 13C4 anti-IP10

segmento V: A27
segmento J: JK2

```

1   E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
-----
55  A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
-----
109 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
     TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

    CDR2
-----
163 R A T G I P D R F S G S G S G T D F
     AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

    CDR3
-----
217 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
     ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

    CDR3
-----
271 Q Y G S S P E Y T F G Q G T K L E I
     CAG TAT GGT ACC TCA CCG GAG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC

325 K
     AAA

```

3 - 33 linea germinal
 6A5
 6A8
 2G1
 10A12
 1E1
 7C10
 1D4

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G M H
 - M -
 -
 -
 - E - - - - - N -
 -

3 - 33 linea germinal
 6A5
 6A8
 2G1
 10A12
 1E1
 7C10
 1D4

W V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I
 -
 -
 -
 -
 -
 -
 -

3 - 33 linea germinal
 6A5
 6A8
 2G1
 10A12
 1E1
 7C10
 1D4

S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
 -
 -
 -
 -
 - K -
 -
 -

6A5
 6A8
 2G1
 10A12
 1E1
 7C10
 1D4

Y Y Y G M D V W G Q T T V T V S S
 -
 N -
 N -
 A F D L - - - - - M -
 G S G S F D Y - - - - - L -
 -

Y Y Y G M D V W G Q T T V T V S S
 -
 N -
 N -
 A F D L - - - - - M -
 G S G S F D Y - - - - - L -
 -

Y Y Y G M D V W G Q T T V T V S S
 -
 N -
 N -
 A F D L - - - - - M -
 G S G S F D Y - - - - - L -
 -

FIGURA 12

3-30.3 linea germinal Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W V R Q
 6B10 VH - - - - - D - - - - - - - - - - - N S - - - - -
 8F6 VH - - - - - - - - - - - N T - G - - - - -

CDR1

3-30.3 linea germinal A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T
 6B10 VH - - - - - L - P F - - - - - Y - - - - - - - - - - -
 8F6 VH - - - - - - - - - - - I I - H - - - - - T - - - - - M

CDR2

3-30.3 linea germinal L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
 6B10 VH - - - - - - - - - - - E G G Y T G Y D G G F D Y W G Q G I L
 8F6 VH V H - - - - - - - - - - - D S S S W Y V Y - - - - - T -

CDR3

6B10 VH V T V S S
 8F6 VH - - - - -

FIGURA 13

4-61 línea germinal: Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G S Y Y W S W I R Q P
 13C4 VH: - - - - - I - - - - - D - - - - -

CDR1

4-61 línea germinal: P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L
 13C4 VH: - - - - - N - - - - -

CDR2

4-61 línea germinal: S S V T A A D T A V Y Y C A R
 13C4 VH: - - - - - G G G T V V R G I I H Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S

CDR3

FIGURA 15

A27 línea germinal	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A	CDR1	
1D4	- - - - -		- - - - - G H - -
2G1	- - - - -		- - - - -
6A5	- - - - -		- - - - -
6A8	- - - - -		- - - - - I - - G - -
10A12	- - - - -		- - - - -
13C4	- - - - -		- - - - -
A27 línea germinal	W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S T	CDR2	
1D4	- - - - -		- - - - - G - - - - -
2G1	- - - - -		- - - - -
6A5	- - - - -		- - - - -
6A8	- - - - -		- - - - -
10A12	- - - - -		- - - - -
13C4	- - - - -		- - - - -
A27 línea germinal	D F T L T I S R L E P E D F A V Y C Q Q Y G S S P	CDR3	
1D4	- - - - -		- - - - - Y T F G Q G T K
2G1	- - - - -		- - - - - P F - - - P - -
6A5	- - - - -		- - - - - I F - - - P - -
6A8	- - - - -		- - - - - - - - G - -
10A12	- - - - -		- - - - - F - - - P - -
13C4	- - - - -		- - - - - E - - - - -
A27 línea germinal	L E I K		
1D4	- - - - -		
2G1	- - - - -		
6A5	- - - - -		
6A8	- - - - -		
10A12	- - - - -		
13C4	- - - - -		

FIGURA 16

L18 línea germinal A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S A L A
 3C4 VK: - - - - - CDR1 - - - - -

L18 línea germinal W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G
 3C4 VK: - - - - - CDR2 - - - - -

L18 línea germinal T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P
 3C4 VK: - - - - - CDR3 - - - - - D - F - H T F G G G T

3C4 VK: K V E I K

FIGURA 18

<p>L15 línea germinal 7C10 VK</p>	<p>D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A</p>	<p style="text-align: center;">CDR1</p>
<p>L15 línea germinal 7C10 VK</p>	<p>W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G</p>	<p style="text-align: center;">CDR2</p>
<p>L15 línea germinal 7C10 VK</p>	<p>T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P</p>	<p style="text-align: center;">CDR3</p>
<p>7C10 VK</p>	<p>K V E I K</p>	

FIGURA 19