

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 470**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2006 E 06786428 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1904104**

54 Título: **Anticuerpos SP35 y usos de éstos**

30 Prioridad:

**08.07.2005 US 697336 P**

**10.02.2006 US 771900 P**

**19.06.2006 US 814522 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.12.2013**

73 Titular/es:

**BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)**

**14 CAMBRIDGE CENTER**

**CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**MI, SHA;**

**PEPINSKY, R. BLAKE;**

**SHAO, ZHAOHUI y**

**GRAFF, CHRISTILYN P.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 434 470 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos SP35 y usos de éstos

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

- 5 Esta invención se refiere a neurología, neurobiología y biología molecular. Más particularmente, esta invención se refiere a anticuerpos Sp35, así como a dichos anticuerpos para uso en el tratamiento de enfermedades, trastornos y lesiones neurológicas tales como lesión en la médula espinal.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Los axones y las dendritas se extienden a partir de las neuronas. La punta distal de un axón o neurita en extensión incluye una región especializada, conocida como el cono de crecimiento. Los conos de crecimiento perciben el entorno local y guían el crecimiento axonal hacia una célula diana de la neurona. Los conos de crecimiento responden a señales del entorno, por ejemplo, adhesividad superficial, factores de crecimiento, neurotransmisores y campos eléctricos. Los conos de crecimiento avanzan generalmente a una velocidad de uno o dos milímetros al día. El cono de crecimiento explora el área por delante de él y a cada lado, mediante elongaciones clasificadas como lamelipodio y filopodio. Cuando una elongación se pone en contacto con una superficie desfavorable, se para. Cuando una elongación se pone en contacto con una superficie de crecimiento favorable, continúa extendiéndose y guía el cono de crecimiento en esa dirección. Cuando el cono de crecimiento alcanza una célula diana apropiada se crea una conexión sináptica.

- 15 La función de la célula nerviosa se ve influida por el contacto entre las neuronas y otras células en su entorno inmediato (Rutishauser, *et al.*, 1988, *Physiol. Rev.*, 68: 819). Estas células incluyen células gliales especializadas, oligodendrocitos en el sistema nervioso central (SNC) y células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP), que revisten el axón neuronal con mielina (Lemke, 1992, en *An Introduction to Molecular Neurobiology*, Z. Hall, Ed., p. 281, Sinauer).

- 20 Las neuronas del SNC tienen el potencial inherente de regenerarse después de una lesión, pero esta acción se inhibe por proteínas inhibitoras presentes en la mielina (Brittiss *et al.*, 2001, *Neuron* 30: 11-14; Jones *et al.*, 2002, *J. Neurosci.* 22: 2792-2803; Grimpe *et al.*, 2002, *J. Neurosci.* 22: 3144-3160).

- 25 Se han caracterizado varias proteínas inhibitoras de mielina encontradas en los oligodendrocitos. Los ejemplos conocidos de proteínas inhibitoras de mielina incluyen NogoA (Chen *et al.*, *Nature*, 2000, 403, 434-439; Grandpre *et al.*, *Nature*, 2000, 403, 439-444), glicoproteína asociada a mielina (MAG) (McKerracher *et al.*, 1994, *Neuron* 13: 805-811; Mukhopadhyay *et al.*, 1994, *Neuron* 13: 757-767) y glicoproteína de oligodendrocitos (OM-gp), Mikol *et al.*, 1988, *J. Cell. Biol.* 106: 1273-1279). Se ha mostrado separadamente que cada una de estas proteínas es un ligando para el receptor neuronal Nogo 1 ((NgR1 (Wang *et al.*, *Nature* 2002, 417, 941-944; Grandpre *et al.*, *Nature* 2000, 403, 439-444; Chen *et al.*, *Nature*, 2000, 403, 434-439; Domeniconi *et al.*, *Neuron* 2002, publicado en línea el 28 de junio, 2002).

- 30 Mi *et al.* (2004) *Nat. neurosci.* 7, 221-228, enseña que Sp35 (LINGO-1) es un componente del complejo de señalización receptor Nogo-66/p75. Mi *et al.* (2005) *Nat. neurosci.* 8, 745-751, enseña que Sp35 (LINGO-1) regula negativamente la mielinización por los oligodendrocitos. WO2004/085648 describe polipéptidos Sp35 y proteína de fusión de éstos, anticuerpos Sp35 y fragmentos de unión a antígeno de éstos y ácidos nucleicos que codifican los mismos.

- 35 El receptor Nogo-1 (NgR1) es una proteína de membrana anclada por GPI que contiene 8 repeticiones ricas en leucina (Fournier *et al.*, 2001, *Nature*, 409: 341-346). Después de la interacción con proteínas inhibitoras (por ejemplo, NogoA, MAG y OM-gp), el complejo NgR1 transduce las señales que dan lugar al colapso del cono de crecimiento y a la inhibición del crecimiento de las neuritas.

- 40 Existe una necesidad insatisfecha de moléculas y métodos para inhibir el colapso del cono de crecimiento mediado por NgR1 y la inhibición resultante del crecimiento de las neuritas. Además, existe una necesidad de moléculas que incrementen la supervivencia neuronal y la regeneración de los axones. Particularmente para el tratamiento de enfermedades, trastornos o lesiones que implican lesión axonal, muerte celular neuronal o de oligodendrocitos, desmielinización o dismielinización o que están relacionados de forma general con el sistema nervioso.

- 45 Dichas enfermedades, trastornos o lesiones incluyen pero no están limitadas a, esclerosis múltiple (MS), leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), encefalomielitis (EPL), mielínolisis pontina central (CPM), adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), Leucodistrofia de células Globoides (enfermedad de Krabbe) y Degeneración Walleriana, neuritis óptica, mielitis transversa, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, lesión en la médula espinal, lesión cerebral traumática, lesión post radiación, complicaciones neurológicas de quimioterapia, ictus, neuropatía óptica isquémica aguda, deficiencia de vitamina E, síndrome de deficiencia de vitamina E aislado, AR, síndrome de

Bassen-Kornzweig, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia del trigémino y parálisis de Bell. Entre estas enfermedades, la MS es la más extendida, afectando aproximadamente a 2,5 millones de personas en todo el mundo.

5 La MS empieza generalmente con un patrón de recaída-remisión de implicación neurológica, que progresa a una fase crónica con daño neurológico creciente. La MS está asociada con la destrucción de la mielina, oligodendrocitos y axones localizados en lesiones crónicas. La desmielinización observada en MS no es siempre permanente y se ha documentado remielinización en estadios tempranos de la enfermedad. La remielinización de las neuronas requiere oligodendrocitos.

10 Varios tratamientos modificadores de la enfermedad están disponibles para MS, incluyendo el uso de corticosteroides e inmunomoduladores tales como interferón beta y Tysabri®. Además, debido al papel central de los oligodendrocitos y mielinización en MS, ha habido esfuerzos para desarrollar terapias para incrementar los números de oligodendrocitos o aumentar la mielinización. Véanse, por ejemplo, Cohen *et al.*, Pat. U.S. No. 5.574.009; Chang *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 346: 165-73 (2002). Sin embargo, permanece una necesidad urgente de idear terapias adicionales para MS y otros trastornos de desmielinización y dismielinización.

### Resumen de la invención

15 La presente descripción se basa en el descubrimiento de que Sp35 (Sp35 también se designa en la bibliografía como LINGO-1 y LRRN6) se expresa en oligodendrocitos y células neuronales y regula negativamente la diferenciación, supervivencia de oligodendrocitos/neuronal y mielinización de axones. Además, determinados antagonistas de Sp35 estimulan la supervivencia, proliferación y diferenciación de oligodendrocitos y células neuronales, así como la mielinización de neuronas. Tomando como base estos descubrimientos, la descripción se refiere generalmente a anticuerpos, fragmento de unión a antígeno o derivados de éstos que pueden usarse como un antagonista de Sp35.

Más particularmente, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste que puede unirse específicamente a Sp35 y puede antagonizar Sp35, en el que el anticuerpo o fragmentos de éste se selecciona del grupo que consiste en:

25 (i) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende una VH, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH son SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79 y una VL, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL son SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147 y SEQ ID NO: 148; y

(ii) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende una VH y una VL, en el que la VH comprende SEQ ID NO: 170 y la VL comprende SEQ ID NO: 283.

30 En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste es un antagonista de la inhibición del crecimiento de las neuritas mediada por Sp35, un antagonista de la inhibición de la mielinización mediada por Sp35 o un antagonista de la inhibición de la diferenciación de los oligodendrocitos mediada por Sp35.

Los aspectos y realizaciones adicionales de la invención se muestran en las reivindicaciones adjuntas.

### Descripción breve de los dibujos/figuras

FIG. 1: Gel de SDS-PAGE que muestra la inmunoprecipitación de Sp35 por anticuerpos monoclonales 1A7 y 2F3.

35 FIG. 2: Resultado de FACS que muestra que los MAbs 1A7 y 2F3 se unieron a células COS-7 ó 293 que expresan Sp35, pero no a células control sin expresión de Sp35.

FIG. 3: Los MAbs 1A7 y 2F3 protegieron a las neuronas DRG de la inhibición mediada por mielina del crecimiento de las neuritas.

40 FIG. 4A-G: Tinción inmunohistoquímica ("IHC") de cocultivos de neuronas DRG y oligodendrocitos tratados con los anticuerpos monoclonales 1A7 y 2F3, o anticuerpo control. Los paneles D y E son aumentos de los paneles B y C, respectivamente. Tinción con anticuerpo anti-βIII-tubulina para identificar los axones, o anticuerpo anti-MBP para identificar los oligodendrocitos. F: Cuantificación de células mielinizantes MBP+ después de tratamiento de cocultivos con 1A7 ó 2F3. G: Análisis por transferencia Western para cuantificar el MBP producido por cocultivos de neuronas DRG y oligodendrocitos tratados con los anticuerpos monoclonales 1A7 y 2F3.

45 FIG. 5A-C: A: Tinción con anticuerpo CC1 de oligodendrocitos de ratón en el modelo cuprizona. B: Tinción con anticuerpo anti-proteína MBP o luxol fast blue de neuronas de ratón en el modelo cuprizona. C: Cuantificación de oligodendrocitos positivos para el anticuerpo CC1 a las cuatro semanas y 6 semanas.

FIG. 6: RGC supervivientes. Tratamiento con el anticuerpo monoclonal 1A7. Los animales tratados con el anticuerpo anti-Sp35 1A7 mostraron una supervivencia neuronal significativa (80%) cuando se comparan con los animales tratados con el anticuerpo control o PBS, cada uno de los cuales sólo mostró aproximadamente 50% de supervivencia neuronal.

5 FIG. 7. Puntuaciones BBB de ratones que recibieron anticuerpo anti-Sp35 1A7 después de lesión en la médula espinal como se describe en el Ejemplo 8.

FIG. 8. Transferencia Western de oligodendrocitos y DRG co-cultivados después de incubación con los anticuerpos anti-Sp35 Li05, Li06 y 3, 10 y 30 mg de Sp35-Fc (LINGO-1-Ig) como se describe en el Ejemplo 9.

10 FIG. 9. Fotografías de los nervios ópticos de A) Ratas Normales; B) Ratas con Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) inducida por la Glicoproteína Mielínica de los Oligodendrocitos (MOG); y C) Ratas con Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) inducida por la Glicoproteína Mielínica de los Oligodendrocitos (MOG) tratadas con el anticuerpo Sp35 1A7. Se muestran micrografías electrónicas de cada nervio óptico debajo de cada fotografía del nervio óptico.

FIG. 10. Gráfico del número de fibras neuronales regenerativas por sección contado en animales que recibieron una inyección intravítrea del anticuerpo Sp35 1A7 después del aplastamiento del nervio óptico.

## 15 Descripción detallada de la descripción

### I. Definiciones

Debe observarse que el término “un” o “una” entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, “un anticuerpo Sp35”, se entiende que representa uno o más anticuerpos Sp35. Como tales, los términos “un” (o “una”), “uno o más”, y “al menos uno” pueden usarse indistintamente en la presente memoria.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término “polipéptido” se pretende que englobe un “polipéptido” en singular así como “polipéptidos” en plural, y se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) unidos de manera lineal por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término “polipéptido” se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Así, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, “proteína”, “cadena de aminoácidos” o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, están incluidos en la definición de “polipéptido” y el término  
25 “polipéptido” puede usarse en lugar de, o indistintamente con, cualquiera de estos términos. El término “polipéptido” también se pretende que se refiera a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo sin limitación glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido  
30 puede derivar de una fuente biológica natural o producirse por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier manera, incluyendo por síntesis química.

Un polipéptido de la descripción puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más ó 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tienen necesariamente dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se refieren como plegados y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, pero en su lugar pueden adoptar una gran número de conformaciones diferentes, y se refieren como no plegados. Tal y como se usa en la presente memoria, el término glicoproteína se refiere a una proteína acoplada al menos a un resto de carbohidrato que está unido a la proteína mediante una cadena lateral que contiene oxígeno o que contiene nitrógeno de un residuo de aminoácido, por ejemplo, un residuo de serina o un residuo de asparagina.  
40

Por un polipéptido “aislado” o un fragmento, variante, o derivado de éste se pretende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede extraerse de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos recombinantemente expresados en células huésped se consideran aislados para los propósitos de la descripción ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado parcialmente o sustancialmente por cualquier técnica adecuada.  
45

También se incluyen como polipéptidos de la presente descripción los fragmentos, derivados, análogos o variantes de los polipéptidos anteriores, y cualquier combinación de éstos. Los términos “fragmento”, “variante”, “derivado” y “análogo” cuando se refieren a anticuerpos Sp35 o polipéptidos de anticuerpo de la presente descripción incluyen cualesquiera polipéptidos que retienen al menos parte de las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo o polipéptido nativo correspondiente. Los fragmentos de polipéptidos de la presente descripción incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección, además de los fragmentos de anticuerpo específicos que se discuten en otro lugar de la  
50

presente memoria. Las variantes de los anticuerpos Sp35 y polipéptidos de anticuerpo de la presente descripción incluyen fragmentos como se ha descrito anteriormente y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ocurrir naturalmente o pueden no ser naturales. Las variantes no naturales pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica.

5 Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Los derivados de los anticuerpos Sp35 y los polipéptidos de anticuerpo de la presente descripción, son polipéptidos que se han alterado de manera que presentan características adicionales no encontradas en el polipéptido nativo. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión. Los polipéptidos variantes también pueden referirse en la presente memoria como "análogos de polipéptido". Tal y como se usa en la presente memoria, un "derivado" de un anticuerpo

10 Sp35 o polipéptido de anticuerpo se refiere a un polipéptido que tiene uno o más residuos derivatizados químicamente por reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como "derivados" aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, 4-hidroxiprolina puede sustituirse por prolina; 5-hidroxilisina puede sustituirse por lisina; 3-metilhistidina puede sustituirse por histidina; homoserina puede sustituirse por serina; y ornitina puede sustituirse por lisina.

15 El término "polinucleótido" se pretende que englobe un ácido nucleico singular así como ácidos nucleicos en plural, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en

20 un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se pretende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo Sp35 contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la descripción. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcialmente o sustancialmente) en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen

25 transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente descripción. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente descripción incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, el polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión a ribosomas o un terminador de la transcripción.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "región codificadora" es una parte de ácido nucleico que consiste en

30 codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de parada" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse que es parte de una región codificadora, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones, y semejantes, no son parte de una región codificadora. Dos o más regiones codificadoras de la descripción pueden estar presentes en una única construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones separadas de polinucleótidos, por

35 ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificadora, o puede comprender dos o más regiones codificadoras, por ejemplo, un único vector puede codificar separadamente una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido, o ácido nucleico de la descripción puede codificar regiones codificadoras heterólogas, bien fusionadas o no fusionadas a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo Sp35 o fragmento, variante o derivado de

40 éste. Las regiones codificadoras heterólogas incluyen sin limitación elementos o restos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.

En determinados casos, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido puede incluir normalmente un promotor y/o otros elementos de control de la transcripción o traducción asociados de manera operativa con una o más regiones codificadoras. Una asociación

45 operativa es cuando una región codificadora para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras de tal manera que la expresión del producto génico se pone bajo la influencia o control de la o las secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificadora de un polipéptido y un promotor asociado con ella) están "asociados de manera operativa" si la inducción de la función promotora resulta en la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión

50 entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interfiere con la capacidad del molde de ADN para ser transcrito. Así, una región promotora estaría asociada de manera operativa con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN sólo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de

55 la transcripción, pueden asociarse de manera operativa con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. Los promotores y otras regiones de control de la transcripción adecuadas se describen en la presente memoria.

5 Los expertos en la técnica conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Éstas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrados, tales como, pero no limitadas a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, conjuntamente con el intrón-A), virus de simio 40 (el promotor temprano) y retrovirus (tal como virus de sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovina y  $\beta$ -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido así como promotores inducibles por linfoquinas (por ejemplo, promotores inducibles por interferones o interleuquinas).

10 De manera similar, los expertos en la técnica conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Éstos incluyen, pero no están limitados a, sitios de unión a ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción y elementos derivados de picornavirus (particularmente un sitio interno de entrada de ribosoma, o IRES, también referido como una secuencia CITE).

En otros casos, un polinucleótido de la descripción es ARN, por ejemplo, en la forma de ARN mensajero (ARNm).

15 Las regiones codificadoras de polinucleótido o ácido nucleico de la descripción pueden estar asociadas con regiones codificadoras adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la descripción. Según la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder de secreción que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena proteica creciente a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica son conscientes de que los polipéptidos secretados por las células de vertebrados tienen generalmente un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o de "longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinados casos, se usa el péptido señal nativo, por ejemplo, se usa un péptido señal de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está asociado de manera operativa con él. Alternativamente, puede usarse un péptido señal de mamíferos heterólogo, o un derivado funcional de éste. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo salvaje puede sustituirse con la secuencia líder del activador de plasminógeno tisular humano (TPA) o  $\beta$ -glucuronidasa de ratón.

30 La presente descripción está dirigida a determinados anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos. A no ser que se refiera específicamente a anticuerpos de tamaño completo tales como anticuerpos naturales, el término "anticuerpos Sp35" engloba anticuerpos de tamaño completo así como fragmentos de unión a antígeno, variantes, análogos o derivados de dichos anticuerpos, por ejemplo, moléculas de anticuerpo o inmunoglobulina naturales o moléculas de anticuerpo preparadas por ingeniería o fragmentos que unen antígeno de una manera similar a las moléculas de anticuerpo.

35 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en la presente memoria. Un anticuerpo o inmunoglobulina comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada, y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras básicas de inmunoglobulina en los sistemas de vertebrados se entienden relativamente bien. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> ed. 1988).

40 Como se discutirá con más detalle más adelante, el término "inmunoglobulina" comprende varias clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG, o IgE, respectivamente. Las subclases (isotipos) de inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, etc. están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por el experto en la técnica a la vista de la presente descripción y, de acuerdo con esto, están en el alcance de la presente descripción. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente en el alcance de la presente descripción, la discusión siguiente estará dirigida generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos con un peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos con un peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas típicamente por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras reúnen a las cadenas pesadas empezando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

55 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí y las partes de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por uniones disulfuro covalentes o uniones no

covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan bien por hibridomas, células B o células huésped modificadas genéticamente por ingeniería. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un extremo N en los extremos en horquilla de la configuración Y hasta el extremo C en el final de cada cadena.

5 Tanto las cadenas ligeras como pesadas están divididas en regiones de homología estructural y funcional. Los términos “constante” y “variable” se usan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables tanto de las partes de cadena ligera ( $V_L$ ) como pesada ( $V_H$ ) determinan el reconocimiento y especificidad de antígeno. A la inversa, los dominios constantes de la cadena ligera ( $C_L$ ) y la cadena pesada ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  o  $C_{H3}$ ) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión a receptor Fc, unión a complemento y semejantes. Por convención, la numeración de los dominios de región constante se incrementa al alejarse del sitio de unión a antígeno o extremo amino del anticuerpo. La parte N terminal es una región variable y la parte C terminal es una región constante; los dominios  $C_{H3}$  y  $C_L$  comprenden realmente el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

15 Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unirse específicamente a epítopos o antígenos. Esto es, el dominio  $V_L$  y el dominio  $V_H$ , o subconjunto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria de anticuerpo forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno está definido por tres CDR en cada una de las cadenas  $V_H$  y  $V_L$ . En algunos casos, por ejemplo, determinadas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélido o preparadas por ingeniería tomando como base inmunoglobulinas de camélido, una molécula completa de inmunoglobulina puede consistir sólo en cadenas pesada, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman, *et al.*, *Nature* 363: 446-448 (1993).

25 En los anticuerpos naturales, las seis “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDR” presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias de aminoácidos cortas, no contiguas que están situadas específicamente para formar el dominio de unión a antígeno al asumir el anticuerpo su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Los aminoácidos restantes en los dominios de unión a antígeno, referidos como regiones “marco”, muestran menos variabilidad inter-molecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación de lámina  $\beta$  y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina  $\beta$ . Así, las regiones marco actúan para formar un andamio que proporciona el posicionamiento de las CDR en una orientación correcta por interacciones inter-cadena, no covalentes. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inunoreactivo. Esta superficie complementaria estimula la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo correspondiente. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, pueden ser identificados fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada y ligera dada por un experto en la técnica, ya que han sido definidos de manera precisa (véase, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987).

40 En el caso en el que existen dos o más definiciones de un término que se usa y/o acepta en la técnica, la definición del término tal y como se usa en la presente memoria se pretende que incluya todos estos significados a no ser que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término “región determinante de la complementariedad” (“CDR”) para describir los sitios de combinación a antígeno no contiguos encontrados en la región variable de los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) y por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987), en las que las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se compara una frente a la otra. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de éste se pretende que esté en el alcance del término como se define y usa en la presente memoria. Los residuos apropiados de aminoácidos que engloban las CDR como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente se muestran más adelante en la Tabla 1 como una comparación. Los números exactos de los residuos que engloban una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar rutinariamente qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

50

Tabla 1. Definiciones de CDR<sup>1</sup>

	<b>Kabat</b>	<b>Chothia</b>
<b>V<sub>H</sub> CDR1</b>	<b>31-35</b>	<b>26-32</b>
<b>V<sub>H</sub> CDR2</b>	<b>50-65</b>	<b>52-58</b>
<b>V<sub>H</sub> CDR3</b>	<b>95-102</b>	<b>95-102</b>
<b>V<sub>L</sub> CDR1</b>	<b>24-34</b>	<b>26-32</b>
<b>V<sub>L</sub> CDR2</b>	<b>50-56</b>	<b>50-52</b>
<b>V<sub>L</sub> CDR3</b>	<b>89-97</b>	<b>91-96</b>

<sup>1</sup>La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 es según las convenciones de numeración mostradas por Kabat *et al.* (véase más adelante).

5 Kabat *et al.*, también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar sin ambigüedad este sistema de “numeración de Kabat” a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de cualquier dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Tal y como se usa en la presente memoria, la “numeración de Kabat” se refiere al sistema de numeración  
10 mostrado por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983). A no ser que se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos de aminoácidos en un anticuerpo Sp35 o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste de la descripción son según el sistema de numeración de Kabat.

15 En especies de camélido, la región variable de cadena pesada, referida como V<sub>H</sub>H, forma el dominio completo de unión a antígeno. Las diferencias principales entre las regiones variables V<sub>H</sub>H de camélidos y aquellas derivadas de anticuerpos convencionales (V<sub>H</sub>) incluyen (a) más aminoácidos hidrofóbicos en la superficie de contacto de la cadena ligera de V<sub>H</sub> comparado con la región correspondiente en V<sub>H</sub>H, (b) una CDR3 más larga en V<sub>H</sub>H, y (c) la aparición frecuente de un enlace disulfuro entre CDR1 y CDR3 en V<sub>H</sub>H.

20 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción incluyen., pero no están limitados a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos de cadena única, fragmentos de unión a epitopo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, Fvs de cadena única (scFV), anticuerpos de cadena única, FVs unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden bien un dominio V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub>, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos Sp35 descritos en la presente memoria). Las moléculas ScFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente US 5.892.019. Las moléculas de  
25 inmunoglobulina o anticuerpo de la descripción pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

30 Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos de cadena única, pueden comprender la o las regiones variables solas o en combinación con todo o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. También están incluidos en la descripción fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. Los anticuerpos o fragmentos inmunoespecíficos de éstos para usarse en los métodos de diagnóstico y terapéuticos descritos en la presente memoria pueden tener cualquier origen animal incluyendo pájaros y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, conejo, cabra, cobaya, camello, llama, caballo o pollo. En otro caso, la región variable puede tener origen  
35 condrictoide (por ejemplo, de tiburones). Tal y como se usa en la presente memoria, los anticuerpos “humanos” incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo en, Pat. U.S. No. 5.939.598 por Kucherlapati *et al.*

40 Tal y como se usa en la presente memoria, el término “parte de cadena pesada” incluye las secuencias de aminoácidos derivadas de la cadena pesada de una inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una parte de cadena pesada comprende al menos uno de: dominio C<sub>H</sub>1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio C<sub>H</sub>2, un dominio C<sub>H</sub>3, o una variante o fragmento de estos. Por ejemplo, un polipéptido de unión puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio C<sub>H</sub>1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio C<sub>H</sub>1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio C<sub>H</sub>2; una cadena polipeptídica que comprende un  
45 dominio C<sub>H</sub>1 y un dominio C<sub>H</sub>3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio C<sub>H</sub>1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio C<sub>H</sub>3 o una cadena polipeptídica que comprende un dominio C<sub>H</sub>1, al menos una parte de un



dominio bisagra, un dominio C<sub>H</sub>2 y un dominio C<sub>H</sub>3. En otro caso, un polipéptido de la descripción comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio C<sub>H</sub>3. Además, un polipéptido de unión puede carecer de al menos una parte de un dominio C<sub>H</sub>2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio C<sub>H</sub>2). Como se ha mostrado anteriormente, un experto en la técnica entenderá que estos dominios (por ejemplo, las partes de cadena pesada) pueden modificarse de manera que varían en la secuencia de aminoácidos respecto a la molécula de inmunoglobulina natural.

En determinados anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos descritos en la presente memoria, las partes de cadena pesada de una cadena polipeptídica de un multímero son idénticas a aquellas en una segunda cadena polipeptídica del multímero. Alternativamente, los monómeros que contienen la parte de cadena pesada de la descripción no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión a diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Las partes de cadena pesada de un polipéptido de unión para usarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una parte de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio C<sub>H</sub>1 derivado de una molécula IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG4.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “parte de cadena ligera” incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferiblemente, la parte de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio V<sub>L</sub> o C<sub>L</sub>.

Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos descritos en la presente memoria pueden describirse o especificarse en términos del epítipo o epítipos o parte o partes de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido diana (Sp35) que reconocen o unen específicamente. La parte de un polipéptido diana que interacciona específicamente con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo es un “epítipo” o un “determinante antigénico”. Un polipéptido diana puede comprender un único epítipo, pero típicamente comprende al menos dos epítipos y puede incluir cualquier número de epítipos, dependiendo del tamaño, conformación y tipo de antígeno. Además, debe observarse que un “epítipo” en un polipéptido diana puede ser o incluir elementos no polipeptídicos, por ejemplo, un “epítipo” puede incluir una cadena lateral de carbohidrato.

Se piensa que el tamaño mínimo de un epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo es aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítipos de péptido o polipéptido contienen preferiblemente al menos siete, más preferiblemente al menos nueve y lo más preferiblemente entre al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Como una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, incluso pueden no estar en la misma cadena peptídica. En la presente descripción, el epítipo de péptido o polipéptido reconocido por los anticuerpos Sp35 de la presente descripción contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferiblemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de Sp35.

Por “se une específicamente”, se quiere decir generalmente que un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno y que la unión conlleva alguna complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo “se une específicamente” a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo al azar, no relacionado. El término “especificidad” se usa en la presente memoria para calificar la afinidad relativa por la que un determinado anticuerpo se une a un determinado epítipo. Por ejemplo, el anticuerpo “A” puede considerarse que tiene una mayor especificidad para un epítipo dado que el anticuerpo “B” o puede decirse que el anticuerpo “A” se une al epítipo “C” con una mayor especificidad de la que tiene para un epítipo “D”.

Por “se une preferentemente” se quiere decir que el anticuerpo se une específicamente a un epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo. Así, un anticuerpo que “se une preferentemente” a un epítipo dado se unirá más probablemente a ese epítipo que a un epítipo relacionado, a pesar de que dicho anticuerpo puede reaccionar de manera cruzada con el epítipo relacionado.

Como ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une a dicho primer epítipo con una constante de disociación (K<sub>D</sub>) que es menor que la K<sub>D</sub> del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la K<sub>D</sub> del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un

primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo epítipo.

En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una velocidad de disociación ( $k(\text{off})$ ) que es menor que la  $k(\text{off})$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la  $k(\text{off})$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la  $k(\text{off})$  del anticuerpo para el segundo epítipo.

Puede decirse que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado descrito en la presente memoria se une a un polipéptido diana descrito en la presente memoria o un fragmento o variante de éste con una velocidad de disociación ( $k(\text{off})$ ) de menos de o igual a  $5 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$  ó  $10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ . Más preferiblemente, puede decirse que un anticuerpo de la descripción se une a un polipéptido diana descrito en la presente memoria o un fragmento o variante de éste con una velocidad de disociación ( $k(\text{off})$ ) menor de o igual a  $5 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$  ó  $10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$  ó  $10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ .

Puede decirse que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado descrito en la presente memoria se une a un polipéptido diana descrito en la presente memoria o un fragmento o variante de éste con una velocidad de asociación ( $k(\text{on})$ ) mayor de o igual a  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  ó  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ . Más preferiblemente, puede decirse que un anticuerpo de la descripción se une a un polipéptido descrito en la presente memoria o un fragmento o variante de éste con una velocidad de asociación ( $k(\text{on})$ ) mayor de o igual a  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  ó  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  ó  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ .

Se dice que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo hasta el punto en el que bloquea, en algún grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos de ELISA de competición. Puede decirse que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado al menos un 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60% o al menos 50%.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988) en las páginas 27-28. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "avidez" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, esto es, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítipos específicos como también con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo altamente repetitiva, tal como un polímero, sería una de alta avidez.

Los anticuerpos Sp35 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medida de relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Así, un anticuerpo reacciona de manera cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo que reacciona de manera cruzada contiene generalmente muchas de las mismas características estructurales complementarias que el epítipo inductor, y en algunos casos, realmente puede ajustarse mejor que el original.

Por ejemplo, determinados anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, respecto a que se unen a epítipos relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, epítipos con al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% y al menos 50% de identidad (según se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con un epítipo de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítipos con menos de 95%, menos de 90%, menos de 85%, menos de 80%, menos de 75%, menos de 70%, menos de 65%, menos de 60%, menos de 55% y menos de 50% de identidad (según se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede considerarse "altamente específico" para un determinado epítipo, si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.

Los anticuerpos Sp35 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la descripción. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o  $K_D$  de menos de  $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  $10^{-2} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $10^{-3} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $10^{-4} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $10^{-5} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $10^{-6} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $10^{-7} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $10^{-8} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $10^{-9} \text{ M}$ ,

$5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ó  $10^{-15}$  M.

Los anticuerpos Sp35 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden ser "multiespecíficos", por ejemplo, biespecíficos, trispecíficos o con una multiespecificidad mayor, lo que significa que reconoce y se une a dos o más epítomos diferentes presentes en uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, proteínas) al mismo tiempo. Así, si un anticuerpo Sp35 es "monoespecífico" o "multiespecífico", por ejemplo, "biespecífico", se refiere al número de epítomos diferentes con los que reacciona un polipéptido de unión. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para epítomos diferentes de un polipéptido diana descrito en la presente memoria o pueden ser específicos para un polipéptido diana así como para un epítomo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "valencia" se refiere al número de dominios de unión potenciales, por ejemplo, dominios de unión a antígeno, presentes en un anticuerpo Sp35, polipéptido de unión o anticuerpo. Cada dominio de unión se une específicamente a un epítomo. Cuando un anticuerpo Sp35, polipéptido de unión o anticuerpo comprende más de un dominio de unión, cada dominio de unión puede unirse específicamente al mismo epítomo, para un anticuerpo con dos dominios de unión, denominado "monoespecífico bivalente" o a epítomos diferentes, para un anticuerpo con dos dominios de unión, denominado "biespecífico bivalente". Un anticuerpo también puede ser biespecífico y bivalente para cada especificidad (denominado "anticuerpos tetravalentes biespecíficos"). En otro caso, pueden prepararse minicuerpos tetravalentes o anticuerpos con dominio delecionado.

Los anticuerpos bivalentes biespecíficos, y los métodos para prepararlos, se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 5.731.168; 5.807.706; 5.821.333; y en las Publ. Solic. U.S. Nos. 2003/020734 y 2002/0155537, incorporándose las descripciones de todas ellas por referencia en la presente memoria. Los anticuerpos tetravalentes biespecíficos, y los métodos para prepararlos, se describen, por ejemplo, en WO 02/096948 y WO 00/44788. Véanse, generalmente, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60-69 (1991); Pat. U.S. Nos. 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992).

Como se ha indicado previamente, las estructuras presentadas y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "dominio  $V_H$ " incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término "dominio  $C_H1$ " incluye el primer (más amino terminal) dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio  $C_H1$  es adyacente al dominio  $V_H$  y es amino terminal respecto a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "dominio  $C_H2$ " incluye la parte de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 hasta el residuo 360 de un anticuerpo usando los esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración EU; véase Kabat EA *et al. op. cit.* El dominio  $C_H2$  es único porque no está emparejado de cerca con otro dominio. En lugar de esto, dos cadenas de carbohidrato ramificadas unidas por N están interpuestas entre los dos dominios  $C_H2$  de una molécula IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio  $C_H3$  se extiende desde el dominio  $C_H2$  al C terminal de la molécula IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "región bisagra" incluye la parte de una molécula de cadena pesada que une el dominio  $C_H1$  con el dominio  $C_H2$ . Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo de esta manera que las dos regiones de unión a antígeno N terminales se muevan independientemente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux *et al.*, *J. Immunol.* 161: 4083 (1998)).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayor parte de las moléculas IgG naturales, las regiones  $C_H1$  y  $C_L$  están unidas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración Kabat (posición 226 ó 229, sistema de numeración EU).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo quimérico" se mantendrá para significar cualquier anticuerpo en el que la región o sitio inmunoreactivo se obtiene o deriva de una primera especie y la región constante (que puede ser intacta, parcial o modificada según la descripción) se obtiene de una segunda especie. En casos preferidos, la región o sitio de unión diana será de una fuente no humana (por ejemplo, ratón o primate) y la región constante es humana.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo preparado por ingeniería” se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable en cualquiera de la cadena pesada y ligera o ambas está alterado por al menos el reemplazo parcial de una o más CDR de un anticuerpo con especificidad conocida y, si es necesario, por reemplazo parcial de la región marco y cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones marco, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de una clase diferente y preferiblemente de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo preparado por ingeniería en el que se injertan una o más CDR “donantes” de un anticuerpo no humano con especificidad conocida en una región marco de cadena pesada o ligera humana se refiere en la presente memoria como un “anticuerpo humanizado”. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable del donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. En lugar de esto, puede ser necesario sólo transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión diana. Dadas las explicaciones mostradas, por ejemplo, en las Pat. U. S. Nos. 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370, estará dentro de la competencia de los expertos en la técnica, bien llevando a cabo experimentación rutinaria o por ensayo de prueba y error, obtener un anticuerpo preparado por ingeniería o humanizado funcional.

15 Tal y como se usa en la presente memoria, el término “polipéptido plegado apropiadamente” incluye polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos Sp35) en los que todos los dominios funcionales que comprenden el polipéptido son claramente activos. Tal y como se usa en la presente memoria, el término “polipéptido plegado inapropiadamente” incluye polipéptidos en los que al menos uno de los dominios funcionales del polipéptido no es activo. En un caso, un polipéptido plegado apropiadamente comprende cadenas polipeptídicas unidas por al menos un enlace disulfuro y, a la inversa, un polipéptido plegado inapropiadamente comprende cadenas polipeptídicas no unidas por al menos un enlace disulfuro.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “preparado por ingeniería” incluye la manipulación de moléculas de ácido nucleico o polipéptido por medios sintéticos (por ejemplo, por técnicas recombinantes, síntesis de péptidos *in vitro*, por acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas).

25 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos “unido”, “fusionado” o “fusión” se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión entre sí de dos o más elementos o componentes, por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una “fusión en marco” se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) de polinucleótidos para formar un ORF continuo, más largo, de una manera que mantiene el marco de lectura de traducción correcto de los ORF originales. Así, una proteína de fusión recombinante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (segmentos que normalmente no están así unidos en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace así continuo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar físicamente o espacialmente separados, por ejemplo, por secuencia conectora en marco. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDR de la región variable de una inmunoglobulina pueden estar fusionados, en marco, pero estar separados por un polinucleótido que codifica al menos una región marco de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDR “fusionadas” se co-traduzcan como parte de un polipéptido continuo.

En el contexto de los polipéptidos, una “secuencia lineal” o una “secuencia” es un orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección amino a carboxi terminal en el que los residuos que son vecinos entre sí en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

40 El término “expresión” tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un proceso por el que un gen produce un producto bioquímico, por ejemplo, un ARN o polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen en la célula incluyendo, sin limitación, inactivación génica así como tanto expresión temporal como expresión estable. Incluye sin limitación la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN en horquilla pequeño (ARNsh), ARN de interferencia pequeño (ARNsi) o cualquier otro producto de ARN y la traducción de dicho ARNm en polipéptido(s). Si el producto final deseado es un producto bioquímico, la expresión incluye la creación de ese producto bioquímico y cualquier precursor. La expresión de un gen produce un “producto génico”. Tal y como se usa en la presente memoria, un producto génico puede ser bien un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en la presente memoria incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones posteriores a la transcripción, por ejemplo, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones posteriores a la traducción, por ejemplo, metilación, glicosilación, la adición de lípidos, asociación con otras subunidades proteicas, escisión proteolítica y semejantes.

55 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a la medidas profilácticas o preventivas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como la progresión de esclerosis múltiple. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la

5 progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia comparado con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya presentan la afección o trastorno así como aquellos con tendencia a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se quiere prevenir la afección o trastorno.

Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se quiere decir cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoo, usados en deportes o de compañía, tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, etc.

10 Tal y como se usan en la presente memoria, las expresiones tales como "un sujeto que se beneficiaría de la administración de un anticuerpo Sp35" y "un animal que necesita tratamiento" incluyen sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo Sp35 usado, por ejemplo, para la detección de un polipéptido Sp35 (por ejemplo, para un procedimiento de diagnóstico) y/o del tratamiento, es decir, paliación o  
 15 prevención de una enfermedad tal como MS, con un anticuerpo Sp35. Como se describe con más detalle en la presente memoria, el anticuerpo Sp35 puede usarse en forma no conjugada o puede conjugarse, por ejemplo, con un fármaco, profármaco o un isótopo.

II. Sp35

El Sp35 humano natural (Sp35) es una proteína glicosilada específica del sistema nervioso central que se predice que tiene 614 aminoácidos (SEQ ID NO: 2), incluyendo una secuencia señal de 33 aminoácidos. Sp35 también se conoce en  
 20 la técnica por los nombres LINGO-1, LRRN6, LRRN6A, FLJ14594, LERN1, MGC17422 y UNQ201. El polipéptido Sp35 humano, de longitud completa de tipo salvaje contiene un dominio LRR que consiste en 14 repeticiones ricas en leucina (incluyendo caperuzas N y C terminales), un dominio Ig, una región transmembrana y un dominio citoplásmico. El dominio citoplásmico contiene un sitio de fosforilación de tirosina canónico. Además, la proteína Sp35 natural contiene  
 25 una secuencia señal, una región básica corta entre el dominio LRRCT e Ig y una región transmembrana entre el dominio Ig y el dominio citoplásmico. El gen Sp35 humano (SEQ ID NO: 1) contiene codones de inicio de la traducción alternativos, de manera que seis aminoácidos adicionales, es decir, MQVSKR (SEQ ID NO:3 ) pueden estar o pueden no estar presentes en el extremo N de la secuencia señal de Sp35. La Tabla 2 lista los dominios de Sp35 y otras regiones, según el número de residuo de aminoácido, tomando como base la secuencia de aminoácidos de Sp35 presentada en la presente memoria como SEQ ID NO: 2. El polipéptido Sp35 se caracteriza con más detalle en la Publicación PCT No.  
 30 WO 2004/085648.

Tabla 2 – Dominios de Sp35

Dominio o Región	Residuo de Comienzo	Residuo de Unión
<b>Secuencia Señal</b>	<b>1</b>	<b>33 ó 35</b>
<b>LRRNT</b>	<b>34 ó 36</b>	<b>64</b>
<b>LRR</b>	<b>66</b>	<b>89</b>
<b>LRR</b>	<b>90</b>	<b>113</b>
<b>LRR</b>	<b>114</b>	<b>137</b>
<b>LRR</b>	<b>138</b>	<b>161</b>
<b>LRR</b>	<b>162</b>	<b>185</b>
<b>LRR</b>	<b>186</b>	<b>209</b>
<b>LRR</b>	<b>210</b>	<b>233</b>
<b>LRR</b>	<b>234</b>	<b>257</b>
<b>LRR</b>	<b>258</b>	<b>281</b>

<b>LRR</b>	<b>282</b>	<b>305</b>
<b>LRR</b>	<b>306</b>	<b>329</b>
<b>LRR</b>	<b>330</b>	<b>353</b>
<b>LRRCT</b>	<b>363</b>	<b>414 ó 416</b>
<b>Básico</b>	<b>415 ó 417</b>	<b>424</b>
<b>Ig</b>	<b>419</b>	<b>493</b>
<b>Secuencia Conectora</b>	<b>494</b>	<b>551</b>
<b>Transmembrana</b>	<b>552</b>	<b>576</b>
<b>Citoplásmico</b>	<b>577</b>	<b>614</b>

5 La distribución tisular y expresión en el desarrollo de Sp35 se han estudiado en seres humanos y ratas. La biología de Sp35 se ha estudiado en un modelo animal experimental (rata). La expresión de Sp35 de rata está localizada en neuronas y oligodendrocitos, según se determina por transferencia northern y tinción inmuno-histoquímica. El nivel de expresión del ARNm de Sp35 de rata está regulado por el desarrollo, con un pico poco después del nacimiento, es decir, aproximadamente en el día uno postnatal. En un modelo de lesión por transección de la médula espinal en rata, Sp35 está regulado al alza en el sitio de la lesión, según se determina por RT-PCR. Véase Mi *et al. Nature Neurosci. 7: 221-228 (2004).*

10 En el contexto de los aminoácidos que comprenden los diferentes dominios estructurales y funcionales de un polipéptido Sp35, el término "aproximadamente" incluye el valor recitado particularmente y los valores mayores o menores por varios (por ejemplo, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1) aminoácidos. Como la localización de estos dominios según se lista en la Tabla 1 se ha predicho por gráficos de ordenador, un experto en la técnica apreciará que los residuos de aminoácidos que constituyen los dominios pueden variar ligeramente (por ejemplo, por aproximadamente 1 a 15 residuos) dependiendo de los criterios usados para definir el dominio.

15 Los inventores han descubierto que Sp35 de tipo salvaje, de longitud completa se une a NgR1. Véase la Publicación PCT No. WO 2004/085648. Los inventores también han descubierto que Sp35 se expresa en oligodendrocitos y que la proteína Sp35 está implicada en la regulación de la mielinización de axones mediada por oligodendrocitos. Véase la Publicación de Patente U.S. No. 2006/0009388 A1.

La secuencia de nucleótidos para la molécula Sp35 de longitud completa es como sigue:

20 **ATGCTGGCGGGGGCGTGAGGAGCATGCCAGCCCCCTCCTGGCCTGCTGGCAGCCATCCTCCTGCTGG  
TGCTGGGCTCAGTGTGTTCAGGCTCGGCCACGGGCTGCCCGCCCGCTGCGAGTGTCCGCCAGGACCG  
CGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCGAGGGCATCCCACCGAGACGCGCCTGCTG  
GACCTAGGCAAGAACCGCATCAAAAACGCTCAACCAGGACGAGTTCCGCCAGCTTCCCGCACCTGGAGGAGC  
TGGAGCTCAACGAGAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCGGGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTCCGGAC  
GCTGGGTCTCCGCAGCAACCGCCTGAAGCTCATCCOGCTAGGCGTCTTCACTGGCCTCAGCAACCTGACC  
AAGCTGGACATCAGCGAGAACAAGATTGTTATCCTGCTGGACTACATGTTTTCAGGACCTGTACAACCTCA  
AGTCACTGGAGGTTGGCGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAGCGGCCCTCAACAGCCT  
GGAGCAGCTGACGCTGGAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCCACCGAGGCGCTGTCCACCTGCACGGC  
CTCATCGTCTGAGGCTCCGGCACCTCAACATCAATGCCATCCGGGACTACTCCTTCAAGAGGCTCTACC  
GACTCAAGGTCTTGGAGATCTCCCACTGGCCCTACTTGGACACCATGACACCCAAGTGCCTCTACGGCCT  
CAACCTGACGTCCCTGTCCATCACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCCCTACCTGGCGTCCGCCACCTA**

GTCTATCTCCGCTTCTCAACCTCTCCTACAACCCCATCAGCACCATTGAGGGCTCCATGTTGCATGAGC  
 TGCTCCGGCTGCAGGAGATCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCTTCCGCGG  
 CCTCAACTACCTGCGCGTGTCAATGTCTCTGGCAACCAGCTGACCACACTGGAGGAATCAGTCTTCCAC  
 TCGTGGGCAACCTGGAGACACTCATCTGGACTCCAACCCGCTGGCCTGCGACTGTGGCTCCTGTGGG  
 TGTTCGGCGCCGCTGGCGGCTCAACTTCAACCGGCAGCAGCCACGTGCGCCACGCCGAGTTTGTCCA  
 GGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGTGCTACTGCCCACTACTTCACCTGCCGCCGCGCCCGCATC  
 CGGGACCGCAAGGCCAGCAGGTGTTTGTGGACGAGGGCCACACGGTGCAGTTTGTGTGCCGGGCCGATG  
 GCGACCCGCGCCCGCCATCCTCTGGCTCTCACCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCAATGGGCG  
 GCTCACAGTCTTCCCTGATGGCAGCTGGAGGTGCGCTACGCCCAGGTACAGGACAACGGCAGTACCTG  
 TGCATCGCGCCAACGCGGGCGGCAACGACTCCATGCCCGCCACCTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCCG  
 ACTGGCCCATCAGCCCAACAAGACCTTCGCTTTTCTCATCTCAACCAGCCGGGCGAGGGAGAGGCCAACAG  
 CACCCGCGCCACTGTGCCCTTCCCCTTCGACATCAAGACCCTCATCATCGCCACCACCATGGGCTTCATC  
 TCTTCTGGGCGTCTGCTCTTCTGCTGGTGTCTGTTTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAA  
 AGCACAACATCGAGATCGAGTATGTGCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAGCTCCGCGGACGCGCCCCG  
 CAAGTTCAACATGAAGATGATATGA (SEQ ID NO:1).

La secuencia polipeptídica para el polipéptido Sp35 de longitud completa es como sigue:

MLAGGVRSMPSPLLACWQPI LLLVLGSVLSGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRFFVAVPEGIPTETRL  
 LDLGKRIKTLNQDEFASFPHLE ELELNENI VSAVEPGAFFNLFNLR TLGLRSNRLKLIPLGVFTGLSN  
 LTKLDISENKIVILLDYMFQDLYNLKSLVGDNDLVYI SHRAFSGLNSLEQLTLEKCNLTSIPTALSH  
 LHGLIVLRLRHLNINAI RDYSFKRLYLKVL EISHWPYLDTMTPNCLYGLNLTSLSI THCNLTAVPYLA  
 VRHLVYLRFLNLSYNPISTI EGSMLHELLRLQEIQLVGGQLAVVEPYAFRGLNYLRVLNVSGNQLTLE  
 ESVFHSGVNLTLI LDSNPLACD RLLWVFRWRRLNFN RQQPTCATPBFVQKBFKDFPDVLLPNYFT  
 CRRARIRDRKAQQVFVDEGH TVQFVCRADGDPPA ILWLSPRKHLVSAKSNGRITVFPDGTLEVRVAQV  
 QDNGTYLCLAAANAGGND SMPAHLHVRSYSPD WPHQPNTFAFISNQPGEGANSTRATVFPFDIKTLI  
 IATTMGPI SFLGVVLFCLVLLFLWSRGKGN TKHNI EIEYVPRKSDAGISSADAPRKFNMKMI (SEQ ID  
 NO:2).

III. Anticuerpos Sp35

5 En un caso, la presente descripción está dirigida a anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos. Por ejemplo, la presente descripción incluye al menos los dominios de unión a antígeno de determinados anticuerpos monoclonales, y fragmentos, variantes y derivados de éstos mostrados en las Tablas 3A y 3B.

10 La Tabla 3A describe las regiones del polipéptido Sp35 que resultan unidas por determinados anticuerpos de longitud completa derivados de bibliotecas de fagos. Estos anticuerpos tienen las mismas regiones variables que los fragmentos Fab derivados de la Biblioteca de Exposición en Fagos-1, según se indica en la Tabla 3B (por ejemplo, D05 en la Tabla 3A tiene la misma región variable que Li05 en la Tabla 3B, D06 en la Tabla 3A tiene la misma región variable que Li06 en la Tabla 3B, etc.). Los anticuerpos se ensayaron para unión a fragmentos Sp35 según se define en la Tabla 3A, usando métodos muy conocidos en la técnica.

15 La Tabla 3B describe la capacidad de los anticuerpos monoclonales nombrados o fragmentos Fab para detectar Sp35 en varios ensayos tales como: Separación Celular Activada por Fluorescencia (FACS), Inmunoprecipitación (IP), Análisis por transferencia Western, Inmunohistoquímica (IHC) y Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA). Los protocolos detallados para realizar estos ensayos se describen en la presente memoria o son muy conocidos y entendidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma listados en la Tabla 3B se produjeron por inyección de Sp35 soluble a ratones y se aislaron usando tecnología de hibridoma que es muy conocida en la técnica y se describe en la presente memoria. Los anticuerpos monoclonales y fragmentos Fab de anticuerpos listados en la Tabla 3B se aislaron a partir de dos bibliotecas de exposición en fago diferentes usando técnicas conocidas en la técnica.

25

Tabla 3A

Fragmento Sp35	D03 (Región Variable de Li03)	D05 (Región Variable de Li05)	D06 (Región Variable de Li06)	D08 (Región Variable de Li08)	D11 (Región Variable de Li03)	D13 (Región Variable de Li13)	D33 (Región Variable de Li33)
1-432 Fc de rata	+	+	+	-	+	-	+
417-493 Fc de rata	-	+/-	+/-	-	-	-	-
Ap-Sp35 (1-419)	N/D	+	-/+	-/+	N/D	N/D	N/D
Ap-Sp35 (418-498)	N/D	-	-	-	N/D	N/D	N/D
417-498 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-
417-503 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-
363-498 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-
244-498 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-



Tabla 3B – Anticuerpos monoclonales Sp35  
Anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma

	FACS		Inmunoprecipitación		Western	Sp35 de ratón/rata	IHC en Transfectadas huSp35	Células mSp35	IHC en Tejidos WT (parafina)	ELISA 34-417	ELISA 419-495	ELISA 1-53	ELISA 34-53
201'	huSp35	mSp35	Sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de ratón/rata	huSp35	WT (parafina)	34-417	419-495	1-53	34-53
3A3	-	-	+	-	-	sí	No (ratón y rata)	N/A	sí	sí		sí	
3A6	++	+/-	++	+++	-/+	no	No (ratón y rata)	no	no	sí		sí	
1A7	++	-	++	+++	-/+	no	No (ratón y rata)	no	no		+/-	sí	
1G7	++	+/-	++	+++	+	no	No (ratón y rata)	no	no			sí	
2B10	++	+/-	+	+++	-/+	no	No (ratón y rata)	no	no	sí		sí	
2C11	-	-	-	-	-	no	No (ratón y rata)	no	no				
2F3	+/-	+/-		+++	+++	sí	sí con mSp35 sobreexpresado	sí	sí	sí		sí	
3P1B1.1F9				+++	-								
3P1D10.2C3				+++	-						+/-	sí	sí
3P1E11.3B7				+++	-						+/-	sí	sí

	FACS	Immunoprecipitación	Western	Sp35 de ratón/ratón	IHC en Transfectadas	IHC en Células	IHC en Tejidos	ELISA			
3P2C6.3G10.2H7	huSp35	Sp35Fc huSp35	huSp35	Sp35 de ratón/ratón	huSp35	mSp35	WT (parafina)	34-417	419 - 493	1-53 2	34-53 2
3P2C9.2G4		+++	-		+++	-			+/-	sí	sí
3P4A6.1D9		+++	-		+++	-			+/-	sí	sí
3P4A1.2B9		+++	-		+++	-			+/-	sí	sí
3P4C2.2D2		+++	+++		+++	+++		sí		sí	
3P4C5.1D8		+++	-		+++	-			+/-	sí	sí
3P4C8.2G9		+++	+++	sí (ratón)	+++	+++		sí		sí	
7P1D5.1G9	+	+++	+++	No (ratón)	+++	+++			+/-	sí	sí
1B6.4	+++	+++ (banda superior)	+++ (banda inferior)	No (ratón)	+++	+++					
2C7.2	+++	+++ (banda superior)	+++ (banda inferior)	No (ratón)	+++	+++					
2D6.1	++ (se une a células 293)	++ (se une a células 293)	-	No (ratón)	-	-					

	FACS	mSp35	Sp35Fc	Immunoprecipitación	Western	Sp35 de ratón/ratón	IHC en Transfectadas huSp35	mSp35	IHC en Tejidos WT (parafina)	KO (parafina)	ELISA	34-53
2F7.3	++	++	Sp35Fc	huSp35 +++ (banda inferior)	huSp35 sí	Sp35 de ratón/ratón	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	1-53 2
2H3.2	++	++		huSp35 +++ (banda inferior)	huSp35 sí	Sp35 de ratón/ratón	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	1-53 2
3C11.1	++	++		huSp35 +++ (banda inferior)	huSp35 sí	Sp35 de ratón/ratón	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	1-53 2
3B3.1	+++	+++		huSp35 +++ (banda superior)	huSp35 no	Sp35 de ratón/ratón	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	1-53 2
3H11.2	++	++		huSp35 +++ (banda inferior)	huSp35 sí	Sp35 de ratón/ratón	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	1-53 2
3G8.1	+	+		huSp35 +++ (banda superior)	huSp35 no	Sp35 de ratón/ratón	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	1-53 2
2B8.1	++	++		huSp35 +++ (banda superior)	huSp35 no	Sp35 de ratón/ratón	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	1-53 2
3B5.2	+++	+++		huSp35 +++ (banda superior)	huSp35 no	Sp35 de ratón/ratón	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	1-53 2

Fragmentos Fab monoclonales derivados de biblioteca de exposición en fago-1

	FACS	Inmunoprecipitación	Western	IHC en Transfectadas	IHC en Tejidos	ELISA
30-C12 (Li01)	huSp35 mSp35	sp35Fc huSp35	mSp35 huSp35	huSp35 mSp35	WT (parafina ) KO (parafina )	34- 417 419 493 495
38-D01 (Li02)		++	++	++		1- 53 2
35-B04 (Li03)		-/+	-/+	-/+		
36-C09 (Li04)		+++	+++	+++		
30-A11 (Li05)	+	-/+	-/+	-/+		
34-F02 (Li06)		++	++	++		

	FACS	Inmunoprecipitación		Western	Sp35 de ratón/ratona	IHC en Transfectadas	Células	IHC en Tejidos	ELISA			
	huSp35	mSp35	sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	417	419	34-53
29-E07 (Li07)				++	++	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	417	419	34-53
34-G04 (Li08)	+/-		+	++	++					417	495	53
36-A12 (Li09)			-	-	-					417	493	2
28-D02 (Li10)			-/+	-/+	+/-					417	495	2
30-B01 (Li11)	++		++	++	++					417	495	2
34-B03 (Li12)			+	+	+					417	495	2

Fragmentos Fab monoclonales derivados de biblioteca de exposición en fago-2

	FACS	Inmunoprecipitación	Western	IHC en Transfectadas	Células	IHC en Tejidos	ELISA	
3383 (1)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	mSp35 N/A	WT (parafina) KO (parafina)	34-417 417 - 493	1-53 2 34-53 2
3495 (2)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	N/A	sí	sí	+/- sí
3563 (3)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	N/A	sí	sí	sí
3564 (4)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	no	no	sí	sí
3565 (5)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	no	no	sí	sí
3566 (6)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	sí	sí	sí	+/- sí
3567 (7)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	sí	sí	sí	+/- sí
3568 (8)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	no	no	sí	sí
3569 (9)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	no	no	sí	sí
3570 (10)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	no	no	sí	sí
3571 (11)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	no	no	sí	sí
3582 (12)	+	huSp35 mSp35 -	huSp35 huSp35	huSp35 huSp35	no	no	sí	sí

	FACS	Immunoprecipitación	Western	IHC en Transfectadas	Células	IHC en Tejidos	ELISA							
1968 (13)	huSp35 +/-	mSp35 -	sp35Fc huSp35 ++	huSp35 débil	Sp35 de ratón/ratón	huSp35 muy tenue	mSp35 sí con fondo	WT (parafina)	KO (parafina)	417	417	419	1-53	34-53
3011	-										417	493	495	2
3012	-												+/-	sí
3013	pegajos													
3418	pegajos													
3422	-													
3562	pegajos													

Anticuerpos monoclonales completos derivados de la biblioteca de exposición en fagos-1

	FACS	Inmunoprecipitación	Western	IHC en Transfectadas	Células	IHC en Tejidos	ELISA			
	huSp35	mSp35	sp35Fc	huSp35	mSp35	WT (parafina)	34-417	419-493	1-532	34-532
D05	++			huSp35	mSp35	Sp35 de ratón/rata	huSp35			
D07	+++			huSp35	mSp35					
D08	++			huSp35	mSp35					
D010	+++			huSp35	mSp35					
D011	+++			huSp35	mSp35					

Leyenda:

huSp35= proteína Sp35 humana

mSp35= proteína Sp35 de ratón

WT= tipo salvaje

KO= inactivado

IHC= inmunohistoquímica

FAS= Separación Celular Activada por Fluorescencia



Tal y como se usa en la presente memoria, el término “domino de unión a antígeno” incluye un sitio que se une específicamente a un epítipo en un antígeno (por ejemplo, un epítipo de Sp35). El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo incluye típicamente al menos una parte de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y al menos una parte de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. El sitio de unión formado por estas regiones variables determina la especificidad del anticuerpo.

La presente descripción está dirigida más específicamente a un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados de éste, en el que el anticuerpo Sp35 se une al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13).

La descripción está encaminada adicionalmente a un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados de éste, en el que el anticuerpo Sp35 inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13) a Sp35.

La descripción también está encaminada a un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados de éste, en el que el anticuerpo Sp35 comprende al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13).

En determinados casos, la descripción está dirigida a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados de éste que se une específicamente o preferentemente a un fragmento o dominio particular del polipéptido Sp35. Dichos fragmentos del polipéptido Sp35 incluyen, pero no están limitados a, un polipéptido Sp35 que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en los aminoácidos 34 a 532; 34 a 417; 34 a 425; 34 a 493; 66 a 532; 66 a 417; 66 a 426; 66 a 493; 66 a 532; 417 a 532; 417 a 425 (la región básica de Sp35); 417 a 493; 417 a 532; 419 a 493 (la región Ig de Sp35); ó 425 a 532 de SEQ ID NO: 2; o un polipéptido variante de Sp35 al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntico a los aminoácidos 34 a 532; 34 a 417; 34 a 425; 34 a 493; 66 a 532; 66 a 417; 66 a 426; 66 a 493; 66 a 532; 417 a 532; 417 a 425 (la región básica de Sp35); 417 a 493; 417 a 532; 419 a 493 (la región Ig de Sp35); ó 425 a 532 de SEQ ID NO: 2.

Los fragmentos peptídicos adicionales de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en una o más repeticiones ricas en leucina (LRR) de Sp35. Dichos fragmentos, incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los aminoácidos 66 a 89; 66 a 113; 66 a 137; 90 a 113; 114 a 137; 138 a 161; 162 a 185; 186 a 209; 210 a 233; 234 a 257; 258 a 281; 282 a 305; 306 a 329; ó 330 a 353 de SEQ ID NO: 2. También se contemplan los fragmentos correspondientes de un polipéptido variante Sp35 al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntico a los aminoácidos 66 a 89; 66 a 113; 90 a 113; 114 a 137; 138 a 161; 162 a 185; 186 a 209; 210 a 233; 234 a 257; 258 a 281; 282 a 305; 306 a 329; ó 330 a 353 de SEQ ID NO: 2.

Los fragmentos peptídicos adicionales de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en una o más regiones ricas en cisteína que flanquean la LRR de Sp35. Dichos fragmentos, incluyen, por ejemplo, un fragmento que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en los aminoácidos 34 a 64 de SEQ ID NO: 2 (la región flanqueante de LRR N-terminal (LRRNT)), o un fragmento que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en los aminoácidos 363 a 416 de SEQ ID NO: 2 (la región flanqueante de LRR C-terminal (LRRCT)). También se contemplan los fragmentos correspondientes de un polipéptido variante Sp35 al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntico a los aminoácidos 34 a 64 y 363 a 416 de SEQ ID NO: 2.

Como se conoce en la técnica, la "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Cuando se discute en la presente memoria, si cualquier polipéptido particular es al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntico a otro polipéptido puede determinarse usando métodos y programas informáticos/software conocidos en la técnica tal como, pero no limitado a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT u otro programa de alineamiento de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia según la descripción, los parámetros se ajustan, por supuesto, de manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia del polipéptido de referencia y se permiten los huecos en homología de hasta 5% del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Los fragmentos peptídicos adicionales de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los aminoácidos 41 a 525 de SEQ ID NO: 2; 40 a 526 de SEQ ID NO: 2; 39 a 527 de SEQ ID NO: 2; 38 a 528 de SEQ ID NO: 2; 37 a 529 de SEQ ID NO: 2; 36 a 530 de SEQ ID NO: 2; 35 a 531 de SEQ ID NO: 2; 34 a 531 de SEQ ID NO: 2; 46 a 520 de SEQ ID NO: 2; 45 a 521 de SEQ ID NO: 2; 44 a 522 de SEQ ID NO: 2; 43 a 523 de SEQ ID NO: 2; y 42 a 524 de SEQ ID NO: 2.

Los fragmentos peptídicos adicionales más de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los aminoácidos 1 a 33 de SEQ ID NO: 2; 1 a 35 de SEQ ID NO: 2; 34 a 64 de SEQ ID NO: 2; 36 a 64 de SEQ ID NO: 2; 66 a 89 de SEQ ID NO: 2; 90 a 113 de SEQ ID NO: 2; 114 a 137 de SEQ ID NO: 2; 138 a 161 de SEQ ID NO: 2; 162 a 185 de SEQ ID NO: 2; 186 a 209 de SEQ ID NO: 2; 210 a 233 de SEQ ID NO: 2; 234 a 257 de SEQ ID NO: 2; 258 a 281 de SEQ ID NO: 2; 282 a 305 de SEQ ID NO: 2; 306 a 329 de SEQ ID NO: 2; 330 a 353 de SEQ ID NO: 2; 363 a 416 de SEQ ID NO: 2; 417 a 424 de SEQ ID NO: 2; 419 a 493 de SEQ ID NO: 2; y 494 a 551 de SEQ ID NO: 2.

Incluso adicionalmente, los fragmentos peptídicos de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los aminoácidos 1 a 33 de SEQ ID NO: 2; 1 a 35 de SEQ ID NO: 2; 1 a 64 de SEQ ID NO: 2; 1 a 89 de SEQ ID NO: 2; 1 a 113 de SEQ ID NO: 2; 1 a 137 de SEQ ID NO: 2; 1 a 161 de SEQ ID NO: 2; 1 a 185 de SEQ ID NO: 2; 1 a 209 de SEQ ID NO: 2; 1 a 233 de SEQ ID NO: 2; 1 a 257 de SEQ ID NO: 2; 1 a 281 de SEQ ID NO: 2; 1 a 305 de SEQ ID NO: 2; 1 a 329 de SEQ ID NO: 2; 1 a 353 de SEQ ID NO: 2; 1 a 416 de SEQ ID NO: 2; 1 a 424 de SEQ ID NO: 2; 1 a 493 de SEQ ID NO: 2; 1 a 551 de SEQ ID NO: 2; 1 a 531 de SEQ ID NO: 2 y 1 a 532 de SEQ ID NO: 2.

Los fragmentos peptídicos adicionales de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los aminoácidos 34 a 64 de SEQ ID NO: 2; 34 a 89 de SEQ ID NO: 2; 34 a 113 de SEQ ID NO: 2; 34 a 137 de SEQ ID NO: 2; 34 a 161 de SEQ ID NO: 2; 34 a 185 de SEQ ID NO: 2; 34 a 209 de SEQ ID NO: 2; 34 a 233 de SEQ ID NO: 2; 34 a 257 de SEQ ID NO: 2; 34 a 281 de SEQ ID NO: 2; 34 a 305 de SEQ ID NO: 2; 34 a 329 de SEQ ID NO: 2; 34 a 353 de SEQ ID NO: 2; 34 a 416 de SEQ ID NO: 2; 34 a 424 de SEQ ID NO: 2; 34 a 493 de SEQ ID NO: 2; y 34 a 551 de SEQ ID NO: 2.

Más fragmentos peptídicos adicionales de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los aminoácidos 34 a 530 de SEQ ID NO: 2; 34 a 531 de SEQ ID NO: 2; 34 a 532 de SEQ ID NO: 2; 34 a 533 de SEQ ID NO: 2; 34 a 534 de SEQ ID NO: 2; 34 a 535 de SEQ ID NO: 2; 34 a 536 de SEQ ID NO: 2; 34 a 537 de SEQ ID NO: 2; 34 a 538 de SEQ ID NO: 2; 34 a 539 de SEQ ID NO: 2; 30 a 532 de SEQ ID NO: 2; 31 a 532 de SEQ ID NO: 2; 32 a 532 de SEQ ID NO: 2; 33 a 532 de SEQ ID NO: 2; 34 a 532 de SEQ ID NO: 2; 35 a 532 de SEQ ID NO: 2; 36 a 532 de SEQ ID NO: 2; 30 a 531 de SEQ ID NO: 2; 31 a 531 de SEQ ID NO: 2; 32 a 531 de SEQ ID NO: 2; 33 a 531 de SEQ ID NO: 2; 34 a 531 de SEQ ID NO: 2; 35 a 531 de SEQ ID NO: 2; y 36 a 531 de SEQ ID NO: 2.

Incluso adicionalmente, los fragmentos peptídicos de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los aminoácidos 36 a 64 de SEQ ID NO: 2; 36 a 89 de SEQ ID NO: 2; 36 a 113 de SEQ ID NO: 2; 36 a 137 de SEQ ID NO: 2; 36 a 161 de SEQ ID NO: 2; 36 a 185 de SEQ ID NO: 2; 36 a 209 de SEQ ID NO: 2; 36 a 233 de SEQ ID NO: 2; 36 a 257 de SEQ ID NO: 2; 36 a 281 de SEQ ID NO: 2.

NO: 2; 36 a 305 de SEQ ID NO: 2; 36 a 329 de SEQ ID NO: 2; 36 a 353 de SEQ ID NO: 2; 36 a 416 de SEQ ID NO: 2; 36 a 424 de SEQ ID NO: 2; 36 a 493 de SEQ ID NO: 2; y 36 a 551 de SEQ ID NO: 2.

5 Los fragmentos peptídicos adicionales de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los aminoácidos 36 a 530 de SEQ ID NO: 2; 36 a 531 de SEQ ID NO: 2; 36 a 532 de SEQ ID NO: 2; 36 a 533 de SEQ ID NO: 2; 36 a 534 de SEQ ID NO: 2; 36 a 535 de SEQ ID NO: 2; 36 a 536 de SEQ ID NO: 2; 36 a 537 de SEQ ID NO: 2; 36 a 538 de SEQ ID NO: 2; y 36 a 539 de SEQ ID NO: 2.

10 Más fragmentos peptídicos de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los aminoácidos 417 a 493 de SEQ ID NO: 2; 417 a 494 de SEQ ID NO: 2; 417 a 495 de SEQ ID NO: 2; 417 a 496 de SEQ ID NO: 2; 417 a 497 de SEQ ID NO: 2; 417 a 498 de SEQ ID NO: 2; 417 a 499 de SEQ ID NO: 2; 417 a 500 de SEQ ID NO: 2; 417 a 492 de SEQ ID NO: 2; 417 a 491 de SEQ ID NO: 2; 412 a 493 de SEQ ID NO: 2; 413 a 493 de SEQ ID NO: 2; 414 a 493 de SEQ ID NO: 2; 415 a 493 de SEQ ID NO: 2; 416 a 493 de SEQ ID NO: 2; 411 a 493 de SEQ ID NO: 2; 410 a 493 de SEQ ID NO: 2; 410 a 494 de SEQ ID NO: 2; 411 a 494 de SEQ ID NO: 2; 412 a 494 de SEQ ID NO: 2; 413 a 494 de SEQ ID NO: 2; 414 a 494 de SEQ ID NO: 2; 415 a 494 de SEQ ID NO: 2; 416 a 494 de SEQ ID NO: 2; 417 a 494 de SEQ ID NO: 2; y 418 a 494 de SEQ ID NO: 2.

20 En un caso, los fragmentos peptídicos de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, un polipéptido Sp35 que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en péptidos del dominio Ig de Sp35 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos. Específicamente, los polipéptidos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en las secuencias de polipéptido siguientes: ITX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 287), ACX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 288), VCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 289) y SPX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 290) en el que X<sub>1</sub> es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina, X<sub>2</sub> es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina y X<sub>3</sub> es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina. Por ejemplo, los  
25 fragmentos peptídicos de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen aquellos fragmentos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en las secuencias de polipéptido siguientes: SPRKH (SEQ ID NO: 291), SPRKK (SEQ ID NO: 292), SPRKR (SEQ ID NO: 293), SPKKH (SEQ ID NO: 294), SPHKH (SEQ ID NO: 295), SPRRH (SEQ ID NO: 296), SPRHH (SEQ ID NO: 297), SPRRR (SEQ ID NO: 298), SPHHH (SEQ ID NO: 299), SPKKK (SEQ ID NO: 300), LSPRKH (SEQ ID NO: 301), LSPRKK (SEQ ID NO: 302), LSPRKR (SEQ ID NO: 303), LSPKKH (SEQ ID NO: 304), LSPHKH (SEQ ID NO: 305), LSPRRH (SEQ ID NO: 306), LSPRHH (SEQ ID NO: 307), LSPRRR (SEQ ID NO: 308), LSPHHH (SEQ ID NO: 309), LSPKKK (SEQ ID NO: 310), WLSPRKH (SEQ ID NO: 311), WLSPRKK (SEQ ID NO: 312), WLSPRKR (SEQ ID NO: 313), WLSPKKH (SEQ ID NO: 314), WLSPHKH (SEQ ID NO: 315), WLSPRRH (SEQ ID NO: 316), WLSPRHH (SEQ ID NO: 317), WLSPRRR (SEQ ID NO: 318), WLSPHHH (SEQ ID NO: 319), WLSPKKK (SEQ ID  
30 NO: 320). Estos polipéptidos Sp35 incluyen el "bucle RKH" básico (Arginina-Lisina-Histidina, aminoácidos 456-458) en el dominio Ig de Sp35. Los péptidos Sp35 adicionales que incluyen un tripéptido básico son ITPKRR (SEQ ID NO: 321), ACHHK (SEQ ID NO: 322) y VCHHK (SEQ ID NO: 323).

40 Los fragmentos peptídicos adicionales de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, un polipéptido Sp35 que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en péptidos del dominio Ig de Sp35 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos. Específicamente, los péptidos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en las secuencias de polipéptido siguientes: X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RKH (SEQ ID NO: 324), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RRR (SEQ ID NO: 325), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>KKK (SEQ ID NO: 326), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>HHH (SEQ ID NO: 327), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RKK (SEQ ID NO: 328), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RKR (SEQ ID NO: 329), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>KKH (SEQ ID NO: 330), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>HKH (SEQ ID NO: 331), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RRH (SEQ ID NO: 332) y X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RHH (SEQ ID NO: 333) en los que X<sub>4</sub> es cualquier aminoácido y X<sub>5</sub> es cualquier aminoácido.  
45

50 En otros casos, los fragmentos peptídicos de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, un polipéptido Sp35 que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en péptidos del dominio Ig de Sp35 o fragmentos, variantes o derivados de dichos polipéptidos. Específicamente, los polipéptidos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en las secuencias de polipéptido siguientes: ITX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 334), ACX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 335), VCX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 336) y SPX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 337) en los que X<sub>6</sub> es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina, X<sub>7</sub> es cualquier aminoácido y X<sub>8</sub> es lisina, arginina, histidina, glutamina o asparagina. Por ejemplo, un polipéptido que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia de polipéptido siguiente: SPRLH (SEQ ID NO: 338).

55 Los fragmentos peptídicos de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, un polipéptido Sp35 que comprende, consiste esencialmente

en, o consiste en péptidos que contienen los aminoácidos 452-458 del dominio Ig de Sp35, o derivados de éstos, en los que el aminoácido 452 es un residuo de triptófano o fenilalanina.

Los fragmentos peptídicos adicionales de Sp35 a los que se unen determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de éstos de la descripción incluyen, un polipéptido Sp35 que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en péptidos del dominio básico de Sp35. Específicamente, los péptidos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en las secuencias de polipéptido siguientes: RRARIRD RK (SEQ ID NO: 339), KKVVKVEKR (SEQ ID NO: 340), RRLRLRDRK (SEQ ID NO: 341), RRGRGRDRK (SEQ ID NO: 342) y RRIRARD RK (SEQ ID NO: 343).

Los polipéptidos Sp35 solubles ejemplares adicionales y los métodos y materiales para obtener estas moléculas para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la descripción pueden encontrarse, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2004/008323.

Los métodos para preparar anticuerpos son muy conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria. Una vez se han producido los anticuerpos frente a varios fragmentos de, o el Sp35 de longitud completa sin la secuencia señal, la determinación de a qué aminoácidos, o epítipo, de Sp35 se une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede determinarse por protocolos de mapeo de epítomos como se describe en la presente memoria así como métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISA sándwich de doble anticuerpo como se describe en "Capítulo 11- Immunology", *Current Protocols in Molecular Biology*, Ed. Ausubel *et al.*, v.2, John Wiley & Sons, Inc. (1996)). Los protocolos adicionales de mapeo de epítomos pueden encontrarse en Morris, G. *Epitope Mapping Protocols*, Nueva Jersey: Humana Press (1996). El mapeo de epítomos también puede realizarse por medios disponibles comercialmente (es decir, ProtoPROBE, Inc. (Milwaukee, Wisconsin)).

Además, los anticuerpos producidos que se unen a cualquier parte de Sp35 pueden cribarse para su capacidad de actuar como un antagonista de Sp35 y estimular así el crecimiento de neuritas, supervivencia, proliferación y diferenciación neuronal y de oligodendrocitos así como estimular la mielinización. Los anticuerpos pueden cribarse para supervivencia de oligodendrocitos/neuronal usando el método como se describe en los Ejemplos 10 y 11. Además, los anticuerpos pueden cribarse para su capacidad de estimular la mielinización usando el método del Ejemplo 9. Finalmente, los anticuerpos pueden cribarse para su capacidad de estimular la proliferación y diferenciación de oligodendrocitos, así como el crecimiento de neuritas usando el método como se describe en el Ejemplo 7. Otras funciones antagonistas de los anticuerpos de la descripción pueden ensayarse usando otros ensayos como se describe en los Ejemplos de la presente memoria.

En otros casos, la descripción incluye un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, que se une específicamente o preferentemente al menos a un epítipo de Sp35, en el que el epítipo comprende, consiste esencialmente en o consiste en al menos aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos de SEQ ID NO: 2, al menos siete, al menos nueve, o entre al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los aminoácidos de un epítipo dado de SEQ ID NO: 2 como se describe pueden ser, pero no necesitan ser, contiguos o lineales. En determinados casos, el al menos un epítipo de Sp35 comprende, consiste esencialmente en o consiste en un epítipo no lineal formado por el dominio extracelular de Sp35 expresado en la superficie de una célula o como un fragmento soluble, por ejemplo, fusionado con una región Fc de IgG. Así, en determinados casos, el al menos un epítipo de Sp35 comprende, consiste esencialmente en o consiste en al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30, o al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 aminoácidos contiguos o no contiguos de SEQ ID NO: 2, en los que los aminoácidos no contiguos forman un epítipo mediante plegamiento proteico.

En otros casos, la descripción incluye un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, que se une específicamente o preferentemente al menos a un epítipo de Sp35, en el que el epítipo comprende, consiste esencialmente en o consiste en, además de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más aminoácidos contiguos o no contiguos de SEQ ID NO: 2 como se ha descrito anteriormente, y puede incluirse un resto adicional que modifica la proteína, por ejemplo, un resto carbohidrato de manera que el anticuerpo Sp35 se une con una mayor afinidad a la proteína diana modificada de lo que lo hace a la versión no modificada de la proteína. Alternativamente, el anticuerpo Sp35 no se une en absoluto a la versión no modificada de la proteína diana.

En determinados casos, la descripción está dirigida a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, que se une específicamente a un polipéptido Sp35 o fragmento de éste, o un polipéptido variante Sp35, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) que es menor que la  $K_D$  para dicho anticuerpo monoclonal de referencia.

En determinados casos, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste de la descripción se une específicamente al menos a un epítipo de Sp35 o fragmento o variante descrita anteriormente, es decir, se une a dicho epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo no relacionado, o al azar; se une preferentemente al

- menos a un epítipo de Sp35 o fragmento o variante descrita anteriormente es decir, se une a dicho epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo; inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia que en sí mismo se une específicamente o preferentemente a un determinado epítipo de Sp35 o fragmento o variante descrita anteriormente; o se une al menos a un epítipo de Sp35 o fragmento o variante descrita anteriormente con una afinidad caracterizada por una constante de disociación  $K_D$  de menos de aproximadamente  $5 \times 10^{-2}$  M, aproximadamente  $10^{-2}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-3}$  M, aproximadamente  $10^{-3}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-4}$  M, aproximadamente  $10^{-4}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-5}$  M, aproximadamente  $10^{-5}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-6}$  M, aproximadamente  $10^{-6}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-7}$  M, aproximadamente  $10^{-7}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-8}$  M, aproximadamente  $10^{-8}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-9}$  M, aproximadamente  $10^{-9}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  M, aproximadamente  $10^{-10}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-11}$  M, aproximadamente  $10^{-11}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-12}$  M, aproximadamente  $10^{-12}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-13}$  M, aproximadamente  $10^{-13}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-14}$  M, aproximadamente  $10^{-14}$  M, aproximadamente  $5 \times 10^{-15}$  M o aproximadamente  $10^{-15}$  M. En un caso particular, el anticuerpo o fragmento de éste se une preferentemente a un polipéptido Sp35 humano o fragmento de éste, respecto a un polipéptido Sp35 murino o fragmento de éste.
- 15 Tal y como se usa en el contexto de constantes de disociación de la unión de un anticuerpo, el término "aproximadamente" permite el grado de variación inherente en los métodos utilizados para medir la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, dependiendo del nivel de precisión de la instrumentación usada, el error estándar basado en el número de muestras medido y el error de redondeo, el término "aproximadamente  $10^{-2}$  M" podría incluir, por ejemplo, de 0,05 M a 0,005 M.
- 20 En casos específicos, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado de éste de la descripción se une a polipéptidos Sp35 o fragmentos o variantes de éstos con una velocidad de disociación (k(off)) de menos de o igual a  $5 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$  ó  $10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ . Alternativamente, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado de éste de la descripción se une a polipéptidos Sp35 o fragmentos o variantes de éstos con una velocidad de disociación (k(off)) de menos de o igual a  $5 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$  ó  $10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$  ó  $10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ .
- 25 En otros casos, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado de éste de la descripción se une a polipéptidos Sp35 o fragmentos o variantes de éstos con una velocidad de asociación (k(on)) mayor de o igual a  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  ó  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ . Alternativamente, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado de éste de la descripción se une a polipéptidos Sp35 o fragmentos o variantes de éstos con una velocidad de asociación (k(on)) mayor de o igual a  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  ó  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  ó  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ .
- 30 En varios casos, un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado de éste como se describe en la presente memoria es un antagonista de la actividad de Sp35. En determinados casos, por ejemplo, la unión de un anticuerpo Sp35 antagonista a Sp35, expresado en neuronas, bloquea la inhibición del crecimiento de neuritas asociado con mielina o la muerte de células neuronales. En otros casos, la unión del anticuerpo Sp35 a Sp35, expresado en oligodendrocitos, bloquea la inhibición del crecimiento o diferenciación de oligodendrocitos o bloquea la desmielinización o dismielinización de las neuronas del SNC.
- 35 A no ser que se indique específicamente, tal y como se usa en la presente memoria un "fragmento de éste" respecto a un anticuerpo se refiere a un fragmento de unión a antígeno, es decir, una parte del anticuerpo que se une específicamente al antígeno. En un caso, un anticuerpo Sp35, por ejemplo, un anticuerpo de la descripción es un anticuerpo SP35 biespecífico, polipéptido de unión o anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, minicuerpo, anticuerpo con dominio deleciónado o proteína de fusión que tiene especificidad de unión para más de un epítipo, por ejemplo, más de un antígeno o más de un epítipo en el mismo antígeno. En un caso, un anticuerpo Sp35 biespecífico, polipéptido de unión o anticuerpo tiene al menos un dominio de unión específico para al menos un epítipo en un polipéptido diana descrito en la presente memoria, por ejemplo, Sp35. En otro caso, un anticuerpo Sp35 biespecífico, polipéptido de unión o anticuerpo tiene al menos un dominio de unión específico para un epítipo en un polipéptido diana y al menos un dominio de unión diana específico para un fármaco o toxina. En otro caso más, un anticuerpo Sp35 biespecífico, polipéptido de unión o anticuerpo tiene al menos un dominio de unión específico para un epítipo en un polipéptido diana descrito en la presente memoria y al menos un dominio de unión específico para un profármaco. Un anticuerpo Sp35 biespecífico, polipéptido de unión o anticuerpo puede ser un anticuerpo tetravalente que tiene dos dominios de unión diana específicos para un epítipo de un polipéptido diana descrito en la presente memoria y dos dominios de unión diana específicos para una segunda diana. Así, un anticuerpo Sp35 biespecífico tetravalente, polipéptido de unión o anticuerpo puede ser bivalente para cada especificidad.
- 40
- 45
- 50
- 55 Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción, como conocen los expertos en la técnica, pueden comprender una región constante que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante de un anticuerpo puede activar el

sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a receptores en varias células a través de la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula.

5 Existen varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo engullimiento y destrucción de las partículas recubiertas por anticuerpo, aclaramiento de los complejos inmunes, lisis de las células diana recubiertas por anticuerpo por las células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas.

De acuerdo con esto, determinados casos de la descripción incluyen un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, en el que al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante ha sido delecionada o alterada de otra manera de manera que se proporcionen características bioquímicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerización no covalente, capacidad incrementada de localizarse en el sitio de un tumor, vida media sérica reducida o vida media sérica incrementada cuando se compara con un anticuerpo completo, inalterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, determinados anticuerpos para usarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria son anticuerpos con dominios delecionados que comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen al menos de una parte de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en determinados anticuerpos, un dominio entero de la región constante del anticuerpo modificado estará delecionado, por ejemplo, todos o parte de los dominios C<sub>H</sub>2 estarán delecionados.

En determinados anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos descritos en la presente memoria, la parte Fc puede estar mutada para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la deleción o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante incrementando de esta manera la localización tumoral. En otros casos puede ser que las modificaciones en la región constante consistentes con la descripción, moderan la unión al complemento y reducen así la vida media sérica y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Otras modificaciones más de la región constante pueden usarse para modificar las uniones disulfuro o restos oligosacáridicos que permiten la localización aumentada debido a una especificidad de antígeno o flexibilidad del anticuerpo incrementadas. El perfil fisiológico, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tales como localización tumoral, biodistribución y vida media sérica, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas muy conocidas sin experimentación excesiva.

Las formas modificadas de los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden prepararse a partir de anticuerpos precursores o parentales completos usando técnicas conocidas en la técnica. Las técnicas ejemplares se discuten con más detalle en la presente memoria.

En determinados casos, tanto las regiones variables como constantes de los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos son totalmente humanas. Los anticuerpos totalmente humanos pueden prepararse usando técnicas que son conocidas en la técnica y como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos totalmente humanos frente a un antígeno específico pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un pulso antigénico, pero cuyos loci endógenos se han inhabilitado. Las técnicas ejemplares que pueden usarse para preparar dichos anticuerpos se describen en las patentes US: 6.150.584; 6.458.592; 6.420.140. Otras técnicas son conocidas en la técnica. Los anticuerpos totalmente humanos pueden producirse asimismo por varias tecnologías de exposición, por ejemplo, exposición en fagos u otros sistemas de exposición virales, como se describe con más detalle en otro lugar de la presente memoria.

Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden prepararse o fabricarse usando técnicas que son conocidas en la técnica. En determinados casos, las moléculas de anticuerpo o fragmentos de éstas se "producen recombinantemente", es decir, se producen usando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas ejemplares para preparar moléculas de anticuerpo o fragmentos de éstas se discuten con más detalle en otro lugar de la presente memoria.

Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción también incluyen derivados que están modificados, por ejemplo, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de manera que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo cognado. Por ejemplo, pero no como limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos

protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de varias modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitado a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

5 En determinados casos, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción no incitarán una respuesta inmune perjudicial en el animal que se va a tratar, por ejemplo, en un ser humano. En un caso, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción se modifican para reducir su inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden humanizarse, primatizarse, desimmunizarse o pueden prepararse anticuerpos quiméricos. Estos tipos de anticuerpos se derivan de un anticuerpo no humano, típicamente un anticuerpo murino o de primate, que retiene o retiene sustancialmente las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo parental, pero que es menos inmunogénico en los seres humanos. Esto puede conseguirse por varios métodos, incluyendo (a) injertar los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) injertar al menos una parte de una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas en regiones marco y constantes humanas con o sin la retención de residuos marco críticos; o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "ocultándolos" con una sección semejante a humana por reemplazo de residuos superficiales. Dichos métodos se describen en Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6851-6855 (1984); Morrison *et al.*, *Adv. Immunol.* 44: 65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28: 489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31: 169-217 (1994) y Pat. U.S. Nos. 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.190.370.

20 La des-inmunización también puede usarse para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "des-inmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítomos de las células T (véanse, por ejemplo, WO9852976A1, WO0034317A2). Por ejemplo, se analizan las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo de partida y se "mapea" un epítipo de células T humano para cada región V que muestra la localización de los epítomos respecto a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otros residuos clave en la secuencia. Los epítomos de células T individuales del mapa de epítomos de células T se analizan con el fin de identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un riesgo bajo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña un rango de secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en un rango de polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos específicos de Sp35 o fragmentos inmunoespecíficos de éstos para usarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria, que se ensayan entonces para función. Típicamente, se generan y ensayan entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Los genes de cadena pesada y ligera completos que comprenden regiones modificadas V y C humanas se clonan en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos completos. Los anticuerpos se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados y se identifica la variante óptima.

35 Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden generarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Pueden producirse anticuerpos policlonales frente a un antígeno de interés por varios procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo Sp35, por ejemplo, un polipéptido de unión, por ejemplo, un anticuerpo específico de Sp35 o fragmento inmunoespecífico de éste puede administrarse a varios animales huésped incluyendo, pero no limitado a, conejos, ratones, ratas, pollos, hámsters, cabras, burros, etc., para inducir la producción de suero que contiene anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. Pueden usarse varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, e incluyen pero no están limitados a, de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias superficiales activas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también son muy conocidos en la técnica.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de exposición en fagos o una combinación de éstas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en la presente memoria no está limitado a anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método por el que se produce. Así, el término "anticuerpo monoclonal" no está limitado a anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. 55 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando ratones con inactivación de Sp35 para incrementar las regiones de reconocimiento de epítipo. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnología de hibridoma y recombinante y de exposición en fagos como se describe en otro lugar de la presente memoria.

- Usando protocolos reconocidos en la técnica, en un ejemplo, se producen anticuerpos en mamíferos por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (por ejemplo, antígenos purificados asociados a tumor tal como Sp35 o células o extractos celulares que comprenden dichos antígenos) y un adyuvante. Esta inmunización incita típicamente una respuesta inmune que comprende la producción de anticuerpos reactivos frente a antígeno a partir de esplenocitos o linfocitos activados. Aunque los anticuerpos resultantes pueden recogerse del suero del animal para proporcionar preparaciones policlonales, frecuentemente es deseable aislar linfocitos individuales del bazo, ganglios linfáticos o sangre periférica para proporcionar preparaciones homogéneas de anticuerpos monoclonales (MAbs). Preferiblemente, los linfocitos se obtienen del bazo.
- En este proceso muy conocido (Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975)) los linfocitos con una vida relativamente corta o mortales de un mamífero al que se ha inyectado un antígeno se fusionan con una línea celular tumoral inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma), produciendo así células híbridas o "hibridomas" que son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente de la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas únicas por selección, dilución y recrecimiento comprendiendo cada cepa individual genes específicos para la formación de un único anticuerpo. Producen anticuerpos que son homogéneos frente a un antígeno deseado y, respecto a su linaje genético puro, se denominan "monoclonales".
- Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma no fusionadas, parentales. Los expertos en la técnica apreciarán que los reactivos, líneas celulares y medios para la formación, selección y crecimiento de los hibridomas están disponibles comercialmente a partir de varias fuentes y protocolos estandarizados muy establecidos. Generalmente, el medio de cultivo en el que se crecen las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales frente al antígeno deseado. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por ensayos *in vitro* tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y crecerse por métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, p 59-103 (1986)). Se apreciará además que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero por procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína-A, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.
- Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> pueden producirse por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio C<sub>H</sub>1 de la cadena pesada.
- Los expertos en la técnica también apreciarán que el ADN que codifica anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, sitios de unión a antígeno) también puede derivar de bibliotecas de anticuerpos, tales como bibliotecas de exposición en fagos. En particular, dicho fago puede utilizarse para exponer dominios de unión a antígeno expresados a partir de una biblioteca de anticuerpos repertorio o combinatoria (por ejemplo, humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con el antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie o lecho sólido. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos incluyendo los dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpo Fav, Fv OE DAB (región Fv individual de cadenas ligeras o pesadas) o Fv estabilizado con disulfuro fusionados recombinantemente con el gen III o gen VIII de la proteína del fago. Los métodos ejemplares se muestran, por ejemplo, en EP 368 684 B1; patente U.S. 5.969.108, Hoogenboom, H.R. y Chames, *Immunol. Today* 21: 371 (2000); Nagy *et al. Nat. Med.* 8: 801 (2002); Huie *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2682 (2001); Lui *et al., J. Mol. Biol.* 315: 1063 (2002). Varias publicaciones (por ejemplo, Marks *et al., Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)) han descrito la producción de anticuerpos humanos con alta afinidad por intercambio de cadenas, así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir grandes bibliotecas de fagos. En otro caso, puede usarse la exposición Ribosomal para reemplazar al bacteriófago como la plataforma de exposición (véase, por ejemplo, Hanes *et al., Nat. Biotechnol.* 18: 1287 (2000); Wilson *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3750 (2001); o Irving *et al., J. Immunol. Methods* 248: 31 (2001)). En otro caso más, pueden cribarse bibliotecas de superficie celular para anticuerpos (Boder *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10701 (2000); Daugherty *et al., J. Immunol. Methods* 243: 211 (2000)). Dichos procedimientos proporcionan alternativas a las técnicas de hibridoma tradicionales para el aislamiento y clonación posterior de anticuerpos monoclonales.
- En los métodos de exposición en fagos, los dominios de anticuerpo funcionales se exponen en la superficie de las partículas de fago que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (por ejemplo, bibliotecas de



ADNc humano o murino de tejidos linfoides) o bibliotecas de ADNc sintético. En determinados casos, el ADN que codifica las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se unen entre sí por un conector scFv por PCR y se clonan en un vector fagémido (por ejemplo, pCANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector se electropora en *E. coli* y la *E. coli* se infecta con el fago auxiliar. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos incluyendo fd y M13 y las regiones V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> habitualmente se fusionan recombinantemente al gen III o gen VIII del fago. Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno de interés (es decir, un polipéptido Sp35 o un fragmento de éste) pueden seleccionarse o identificarse con el antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie o lecho sólido.

Los ejemplos adicionales de métodos de exposición en fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos incluyen aquellos descritos en Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persio *et al.*, *Gene* 187: 9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994); Solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Pat. U.S. Nos. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de los fagos, las regiones codificadoras del anticuerpo del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células de plantas, levaduras y bacterias. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> también pueden emplearse usando los métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12(6): 864-869 (1992); y Sawai *et al.*, *AJRI* 34: 26-34 (1995); y Better *et al.*, *Science* 240: 1041-1043 (1988).

Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv y anticuerpos de cadena única incluyen aquellos descritos en Pat. U.S. Nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu *et al.*, *PNAS* 90: 7995-7999 (1993); y Skerra *et al.*, *Science* 240: 1038-1040 (1988). Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo derivan de especies diferentes de animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4: 214 (1986); Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125: 191-202 (1989); Pat. U.S. Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo derivadas de un anticuerpo de una especie no humana que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Frecuentemente, los residuos marco en las regiones marco humanas se sustituirán por el residuo correspondiente de la CDR del anticuerpo donante para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones marco se identifican por métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de los residuos CDR y marco para identificar residuos marco importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen *et al.*, Pat. U.S. No. 5.585.089; Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323 (1988)). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; Pat. U.S. Nos. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o modificación en superficie (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6): 805-814 (1994); Roguska *et al.*, *PNAS* 91: 969-973 (1994)), e intercambio de cadenas (Pat. U.S. No. 5.565.332).

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse por una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de exposición en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también, Pat. U.S. Nos. 4.444.887 y 4.716.111; y publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, los complejos de genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas humanas pueden introducirse aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable, región constante y región de diversidad humanas pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanas. Los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas de ratón pueden convertirse en no funcionales separadamente o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulinas humanas por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región JH evita la producción

endógena de anticuerpos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían para producir descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una parte de un polipéptido diana deseado. Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno pueden obtenerse a partir de los ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulinas humanas albergadas por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de las células B y experimentan posteriormente un cambio de clase y mutación somática. Así, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión global de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lanberg y Huszar *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; Pat. U.S. Nos. 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; y 5.939.598. Además, empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) y GenPharm (San Jose, Calif.) pueden estar involucradas para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos frente a un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse usando una técnica referida como una "selección guiada". En esta estrategia, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers *et al.*, *Bio/Technology* 12: 899-903 (1988). Véase, también, Patente U.S. No. 5.565.332.

Además, los anticuerpos para tomar como diana polipéptidos de la descripción pueden utilizarse, a su vez, para generar anticuerpos anti-idiotipo que "mimetizan" los polipéptidos diana usando técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Greenspan y Bona, *FASEB J.* 7(5): 437-444 (1989) y Nissinoff, *J. Immunol.* 147(8): 2429-2438 (1991)). Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a e inhiben competitivamente la multimerización polipeptídica y/o la unión de un polipéptido de la descripción a un ligando pueden usarse para generar anti-idiotipos que "mimetizan" la multimerización polipeptídica y/o el dominio de unión y, consecuentemente, se unen a y neutralizan el polipéptido y/o su ligando. Dichos anti-idiotipos neutralizantes o fragmentos Fab de dichos anti-idiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando del polipéptido. Por ejemplo, dichos anticuerpos anti-idiotípicos pueden usarse para unirse a un polipéptido diana deseado y/o para unirse a sus ligandos/receptores y, de esta manera, bloquear su actividad biológica.

En otro caso, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales deseados puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven como una fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, que se transfectan en células huésped procariotas o eucariotas tales como células de *E.coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma las inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético como se describe en la presente memoria) puede usarse para clonar secuencias de región constante y variable para la fabricación de anticuerpos como se describe en Newman *et al.*, Pat. U.S. No. 5.658.570, presentada el 25 de enero, 1995. Esencialmente, esto conlleva la extracción de ARN de las células seleccionadas, conversión a ADNc y amplificación por PCR usando cebadores específicos de Ig. Los cebadores adecuados para este propósito también se describen en Pat. U.S. No. 5.658.570. Como se discutirá con más detalle más adelante, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado pueden crecerse en cantidades relativamente grandes para proporcionar suministros clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

En un caso, un anticuerpo Sp35 de la descripción comprende al menos una CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo. En otro caso, un anticuerpo Sp35 de la descripción comprende al menos dos CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otro caso, un anticuerpo Sp35 de la descripción comprende al menos tres CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otro caso, un anticuerpo Sp35 de la descripción comprende al menos cuatro CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otro caso, un anticuerpo Sp35 de la descripción comprende al menos cinco CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otro caso, un anticuerpo Sp35 de la descripción comprende al menos seis CDR de una o más moléculas de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo ejemplares que comprenden al menos una CDR que pueden incluirse en los anticuerpos Sp35 sujeto se describen en la presente memoria.

En un caso específico, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de la cadena pesada y/o ligera pueden inspeccionarse para identificar las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) por métodos que son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de la cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas de ADN recombinante rutinarias, una o más de las CDR pueden insertarse en regiones marco, por

ejemplo, en regiones marco humanas para humanizar un anticuerpo no humano. Las regiones marco pueden ser naturales o regiones marco consenso y preferiblemente regiones marco humanas (véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998) para un listado de regiones marco humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente al menos a un epítipo de un polipéptido deseado, por ejemplo, Sp35. Preferiblemente, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones marco y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Además, dichos métodos pueden usarse para preparar sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracadena para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracadena. Otras alteraciones en el polinucleótido están englobadas por la descripción y se encuentran en la técnica.

Además, pueden usarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 851-855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604-608 (1984); Takeda *et al.*, *Nature* 314: 452-454 (1985)) mediante el corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón con una especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana con la actividad biológica apropiada. Tal y como se usa en la presente memoria, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes derivan de especies de animales diferentes, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Alternativamente, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (Pat. U.S. No. 4.694.778; Bird, *Science* 242: 423-442 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988); y Ward *et al.*, *Nature* 334: 544-554 (1989)) para producir anticuerpos de cadena única. Los anticuerpos de cadena única se forman por la unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácido, lo que resulta en un anticuerpo de cadena única. También pueden usarse las técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra *et al.*, *Science* 242: 1038-1041 (1988)).

Otros casos adicionales de la descripción comprenden la generación de anticuerpos humanos o sustancialmente humanos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son incapaces de la producción endógena de inmunoglobulinas (véase, por ejemplo, Pat. U.S. Nos. 6.075.181, 5.939.598, 5.591.669 y 5.589.369 cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia). Por ejemplo, se ha descrito que la deleción homocigota de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal resulta en la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de un matriz génica de inmunoglobulinas humanas a dichos ratones mutantes de la línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos después del pulso con el antígeno. Otro medio preferido para generar anticuerpos humanos usando ratones SCID se describe en Pat. U.S. No. 5.811.524. Se apreciará que el material genético asociado con estos anticuerpos humanos también puede aislarse y manipularse como se describe en la presente memoria.

Otro medio altamente eficaz adicional para generar anticuerpos recombinantes está descrito por Newman, *Biotechnology* 10: 1455-1460 (1992). Específicamente, esta técnica resulta en la generación de anticuerpos primatizados que contienen dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. Además, esta técnica también está descrita en las Pat. U.S. Nos. 5.658.570, 5.693.780 y 5.756.096 asignadas comúnmente.

En otro caso, los linfocitos pueden seleccionarse por micromanipulación y aislarse los genes variables. Por ejemplo, pueden aislarse células mononucleares de sangre periférica de un mamífero inmunizado y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos pueden cribarse para IgG específicas que cumplan los criterios del cribado. Las células de pocillos positivos pueden aislarse. Las células B productoras de IgG individuales pueden aislarse por FACS o identificándolas en un ensayo en placa hemolítico mediado por complemento. Las células B productoras de Ig pueden micromanipularse en un tubo y los genes V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden amplificarse usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpo y transferirse a células (por ejemplo, células eucariotas o procariontas) para expresión.

Alternativamente, las líneas celulares productoras de anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse usando técnicas muy conocidas para el experto en la técnica. Dichas técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones importantes. A este respecto, las técnicas adecuadas para uso en la descripción como se describe más adelante se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991).

Los anticuerpos para uso en los métodos de diagnóstico y terapéuticos descritos en la presente memoria pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o, preferiblemente, por técnicas de expresión recombinante como se describe en la presente memoria.

En un caso, un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste de la descripción comprende una región constante sintética en la que uno o más dominios están parcialmente o totalmente delecionados

("anticuerpos con dominio deleciónado"). En determinados casos, anticuerpos modificados compatibles comprenderán construcciones o variantes con dominio deleciónado en los se ha eliminado el dominio C<sub>H</sub>2 entero (construcciones ΔC<sub>H</sub>2). Para otros casos, puede utilizarse un péptido conector corto para sustituir el dominio deleciónado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento a la región variable. Los expertos en la técnica apreciarán que dichas construcciones son particularmente preferidas debido a las propiedades reguladoras del dominio C<sub>H</sub>2 en la velocidad catabólica del anticuerpo. Las construcciones con dominio deleciónado pueden derivarse usando un vector (por ejemplo, de Biogen IDEC Incorporated) que codifica un dominio constante humano de IgG<sub>1</sub> (véase, por ejemplo, WO 02/060955 A2 y WO02/096948A2). Este vector ejemplar se preparó por ingeniería para deleciónar el dominio C<sub>H</sub>2 y proporcionar un vector sintético que expresa una región constante de IgG<sub>1</sub> con dominio deleciónado.

10 En determinados casos, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción son minicuerpos. Los minicuerpos pueden prepararse usando métodos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, patente US 5.837.821 o WO 94/09817A1).

15 En un caso, un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste de la descripción comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene deleción o sustitución de unos pocos o incluso un único aminoácido siempre que permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio C<sub>H</sub>2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc y de esta manera incrementar la localización tumoral. De manera similar, puede ser deseable deleciónar simplemente la parte de uno o más dominios de región constante que controla la función efectora (por ejemplo, unión del complemento) que se va a modular. Dichas deleciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero) mientras deja otras funciones deseables asociadas con el dominio de región constante sujetos intactos. Además, como se ha aludido anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que aumenta el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible disrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Otros casos adicionales comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para aumentar características deseables tales como función efectora o proporcionar más unión de citotoxina o carbohidrato. En dichos casos, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

20 La presente descripción también proporciona anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones V<sub>H</sub> y/o regiones V<sub>L</sub>) descritas en la presente memoria, uniéndose inmunoespecíficamente estos anticuerpos o fragmentos de éstos a un polipéptido Sp35 o fragmento o variante de éste. Las técnicas estándar conocidas para los expertos en la técnica pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo Sp35, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR que resultan en sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto a la región V<sub>H</sub> de referencia, V<sub>H</sub>CDR1, V<sub>H</sub>CDR2, V<sub>H</sub>CDR3, región V<sub>L</sub>, V<sub>L</sub>CDR1, V<sub>L</sub>CDR2 o V<sub>L</sub>CDR3. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificadora, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para actividad biológica para identificar los mutantes que retienen la actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un polipéptido Sp35).

25 Por ejemplo, es posible introducir mutaciones sólo en las regiones marco o sólo en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones silenciosas o sustitutivas neutras, es decir, no tienen ningún efecto o tienen poco efecto en la capacidad de un anticuerpo de unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un híbrido. Alternativamente, las mutaciones sustitutivas no neutras pueden alterar la capacidad de un anticuerpo de unirse al antígeno. La localización de la mayor parte de las mutaciones silenciosas y sustitutivas neutras probablemente sea en las regiones marco, mientras que la localización de la mayor parte de las mutaciones sustitutivas no neutras

probablemente sea en CDR, aunque esto no es un requerimiento absoluto. Un experto en la técnica será capaz de diseñar y ensayar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como ausencia de alteración en la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse rutinariamente y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad de unirse inmunoespecíficamente al menos a un epítipo de un polipéptido Sp35) puede determinarse usando técnicas descritas en la presente memoria o modificando rutinariamente técnicas conocidas en la técnica.

**IV. Polinucleótidos que codifican anticuerpos Sp35**

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción.

En un caso, la presente descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH), en la que al menos una de las CDR de la región variable de la cadena pesada o al menos dos de las CDR de la región variable de la cadena pesada son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas a las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada de referencia de anticuerpos Sp35 monoclonales descritos en la presente memoria. Alternativamente, las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas a las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de referencia de anticuerpos Sp35 monoclonales descritos en la presente memoria. Así, según este caso una región variable de la cadena pesada de la descripción tiene secuencias polipeptídicas de CDR1, CDR2 o CDR3 relacionadas con las secuencias polipeptídicas mostradas en la Tabla 4:

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH de referencia\*

Nombre del Anticuerpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Li10	P=YPMV (SEQ ID NO:6)	P=WIGPSGGVTAYADSVKG (SEQ ID NO:8)	P=PYSSGWWDFDL (SEQ ID NO:10)
	N=ACTTACCCTATGGTT (SEQ ID NO:5)	N=IGGATCGGTCCTTCT GGTGGCGTTACTGCTTA TGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:7)	N=CCCTATAGCAGTGGCT GGTGGGACTTCGATCTC (SEQ ID NO:9)
Li07	P=MYFMG (SEQ ID NO:12)	P=SISPSGGFTSYADSVKG (SEQ ID NO:14)	P=DRHAFDI (SEQ ID NO:16)
	N=ATGTACTTTATGGGT (SEQ ID NO:11)	N=TCTATCTCTCCTTCTGGTGGCTTAC TICTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:13)	N=GATCGGCATGCTTTTGATATC (SEQ ID NO:15)
Li05	P=AYAMG (SEQ ID NO:18)	P=SIVSSGGYTDYADSVKG (SEQ ID NO:20)	P=EGDHNAFDI (SEQ ID NO:22)
	N=CTIACGCTATGGGT (SEQ ID NO:17)	N=TCTATCGTTTCTTCTGGTGGCT ATACTGATTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:19)	N=GAGGGTGACCATAATGCTTTT GATATC (SEQ ID NO:21)
Li11	P=SYAMY (SEQ ID NO:24)	P=SISTSGGYTGYADSVKG (SEQ ID NO:26)	P=DTSNDYDDYMDV (SEQ ID NO:28)
	N=TCTTACGCTATGTAT (SEQ ID NO:23)	N=TCTATCTCTACTTCTGGTGGCTA TACTGGTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:25)	N=GATACCAGCGATAATGAC TACTACTACATGGACGTC (SEQ ID NO:27)
Li01	P=KYQMT (SEQ ID NO:30)	P=SIYPSGGNTVYADSVKG (SEQ ID NO:32)	P=GITTEAVFDY (SEQ ID NO:34)

Hombre del Anticuerpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
	N=AAGTACCAGATGAC (SEQ ID NO:29)	N=TCTATCTATCCTTCTGGTGGCAA TACTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:31)	N=GGGACTACAGAGGCAGTCTT TQACTAC (SEQ ID NO:33)
Li12	P=QYNMF (SEQ ID NO:36)	P=RISSSGGMTMYADSVKG (SEQ ID NO:38)	P=EARLPYCSCGGSCSYDYYYYGMDV (SEQ ID NO:40)
	N=CAGTACAATATGTTT (SEQ ID NO:35)	N=CGTATCTCTCTTCTGGTGGCAT GACTATGTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:37)	N=GAAGCGTTACGGCCTTATTG TAGTGGTGGTAGCTGCTACTCCG ACTACTACTACTACGGTATGGAC GTC (SEQ ID NO:39)
Li06	P=EYPMD (SEQ ID NO:42)	P=SIYSSGGSTVYADSVKG (SEQ ID NO:44)	P=EGDSDAFDI (SEQ ID NO:46)
	N=GAGTACCCTATGGAT (SEQ ID NO:41)	N=TCTATCTATCTCTCTGGTGGCTC TACTGTTTATGCTGACTCCATTAAGGT (SEQ ID NO:43)	N=GAGGGTGAAGCTCTGATGCTTTT GATAC (SEQ ID NO:45)
Li08	P=HYEMV (SEQ ID NO:48)	P=SIRSSGGATKYADSVKG (SEQ ID NO:50)	P=ESPDDYFDY (SEQ ID NO:52)
	N=CATTACGAGATGTTT (SEQ ID NO:47)	N=TCTATCCGTTCTTCTGGTGGCGCTAC TAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:49)	N=GAGTCGCGACAGCAGCTACTTT GACTAC (SEQ ID NO:51)
Li03	P=QYPME (SEQ ID NO:54)	P=GIYPSGGSTVYADSVKG (SEQ ID NO:56)	P=AGQWLGDFDY (SEQ ID NO:58)
	N=CAGTACCCTATGGAG (SEQ ID NO:53)	N=GGTATCTATCCTTCTGGTGGCTCTA CTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:55)	N=GCGGGGCGAGTGGCTGGGGGAC TTTGACTAC (SEQ ID NO:57)
Li09	P=MYSMV (SEQ ID NO:60)	P=YISPSGGKTYADSVKG (SEQ ID NO:62)	P=DSRRRYDFWSGYHNYYYYYMDV (SEQ ID NO:64)
	N=ATGTACTCTATGTTT (SEQ ID NO:59)	N=TATATCTCTCTCTGGTGGCAAG ACTATGTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:61)	N=GATTCGAGACGCGGATTACGA TTTTGGAGTGGTTATCACAACTACT ACTACTACTACATGGACGTC (SEQ ID NO:63)
Li04	P=RYNMO (SEQ ID NO:66)	P=VIYPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO:68)	P=SIADDAFDI (SEQ ID NO:70)
	N=CGTTACAATATGGGT (SEQ ID NO:65)	N=GTTATCTATCCTTCTGGTGGCGGT ACTCATTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO:67)	N=TCTATAGCAGATGATGCTTTTGATAC (SEQ ID NO:69)
Li02	P=TYEMI (SEQ ID NO:72)	P=SIGPSGGLTWYADSVKG (SEQ ID NO:74)	P=MYYCVRIDSSGWAFDI (SEQ ID NO:76)
	N=ACTACGAGATGATT (SEQ ID NO:71)	N=TCTATCGGCTCTCTGGTGGCC TTACTTGGTATGCTGACTCCGTTAAA (SEQ ID NO:73)	N=ATGTATTACTGTGTACGGATTGATGA TAGTAGTGGTTGGCTTTTGATATC (SEQ ID NO:75)
Li13	P=HYEMY (SEQ ID NO:389)	P=RIVSSGGFTKYADSVKG (SEQ ID NO:390)	P=EGDNDAFDI (SEQ ID NO:391)
Li32	P=AYMMQ (SEQ ID NO:395)	P=SISPSGGNTKYADSVKG (SEQ ID NO:396)	P=GDYGYWDFP (SEQ ID NO:397)
Li33	P=IYPMF (SEQ ID NO:401)	P=WIGPSGGITKYADSVKG (SEQ ID NO:402)	P=EGHNDWYFDL (SEQ ID NO:403)
Li34	P=NYEMY (SEQ ID NO:407)	P=GIYSSGGITVYADSVKG (SEQ ID NO:408)	P=AAILDWYFDL (SEQ ID NO:409)
IA47	P=NYGMN (SEQ ID NO:77)	P=WINDTIGTEPTYTEDFQG (SEQ ID NO:78)	P=EGVHFDY (SEQ ID NO:79)
2F3	P=FSDAWLD (SEQ ID NO:80)	P=EIRSKANNHATNYAESVKG (SEQ ID NO:81)	P=SFAY (SEQ ID NO:82)
3P1D10.2C3 y 3P1E11.3B7	P=SSWTQ (SEQ ID NO:83)	P=AIYPGDGDTRYTQKFKG (SEQ ID NO:84)	P=HNSYGMIDY (SEQ ID NO:85)
Li1a.01	P=GYSFTNYWIG (SEQ ID NO:195)	P=IDPDDSYTTYSPSFQG (SEQ ID NO:196)	P=AEFYWQAYDG (SEQ ID NO:197)
Li1a.02	P=GGSRGNYSWS (SEQ ID NO:198)	P=SIYSGFTNPSLKG (SEQ ID NO:199)	P=VRHWYFDV (SEQ ID NO:200)
Li1a.03	P=GYTFNGFDMH (SEQ ID NO:201)	P=WIDPYNGSTTYAQKFKG (SEQ ID NO:202)	P=DFYMDGHYIFDV (SEQ ID NO:203)
Li1a.04	P=GYSFSNYIYH (SEQ ID NO:204)	P=IDPQDSFTSYSPSFQG (SEQ ID NO:205)	P=DLAWIDYGFYD (SEQ ID NO:206)
Li1a.05	P=GFITTSHTVYS (SEQ ID NO:207)	P=SIYNGSTTYADSVKG (SEQ ID NO:208)	P=FYGDFDS (SEQ ID NO:209)
Li1a.06	P=GFITSSNWMS (SEQ ID NO:210)	P=TIYSGSSTTYADSVKG (SEQ ID NO:211)	P=DLPMKGFQRYGFDDV (SEQ ID NO:212)

Hombre del Anticuerpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
L1a.07	P=GFTFSQYALS (SEQ ID NO:213)	P=TIWGGSGSTTYADSVKG (SEQ ID NO:214)	P=EYWYYDQPTAV (SEQ ID NO:215)
L1a.08	P=GDSVSSNSAAWS (SEQ ID NO:216)	P=RIYYRSKWYNDYAVSVKS (SEQ ID NO:217)	P=EVYSAGIMDY (SEQ ID NO:218)
L1a.09	P=GYSFTNHWIG (SEQ ID NO:219)	P=IDFSDSDTINYSPSFQG (SEQ ID NO:220)	P=GFYGIADTFDV (SEQ ID NO:221)
L1a.10	P=GYSFTNYWIA (SEQ ID NO:222)	P=MIYPDDSNTINYSPSFQG (SEQ ID NO:223)	P=TNYLGFYDS (SEQ ID NO:224)
L1a.11	P=GFTFSDYQIS (SEQ ID NO:225)	P=NILYDGSBTYYADSVKG (SEQ ID NO:226)	P=GYPIDDYSPDI (SEQ ID NO:227)
L1a.12	P=GDSVSDNSAAWG (SEQ ID NO:228)	P=RIYYRSKWYNDYAVSVKS (SEQ ID NO:229)	P=GRHEYGGLGYAEAMDH (SEQ ID NO:230)
L1a.13	P=GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:231)	P=AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:232)	P=HYTYMHFEDY (SEQ ID NO:233)

\* Determinado por el sistema Kabat (véase anteriormente).

N= secuencia de nucleótidos, P= secuencia polipeptídica.

5 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VH codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

10 En otro caso, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina en la que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos CDR1, CDR2 y CDR3 mostrados en la Tabla 4. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VH codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

15 En un caso adicional, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina en la que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están codificadas por secuencias de nucleótidos que son idénticas a las secuencias de nucleótidos que codifican los grupos CDR1, CDR2 y CDR3 mostrados en la Tabla 4. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VH codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

20 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VH codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en: 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li022), 35-E04 (Li033), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13) o inhibirá competitivamente la unión de dicho anticuerpo monoclonal a Sp35.

30 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VH codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente a un polipéptido Sp35 o fragmento de éste, o un polipéptido variante Sp35, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) no mayor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ó  $10^{-15}$  M.

35 En otro caso, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina, en la que al menos una de las CDR de la región variable de la cadena ligera o al menos dos de las CDR de la región variable de la cadena ligera son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas a las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera de referencia de anticuerpos Sp35 monoclonales descritos en la presente memoria. Alternativamente, las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas a las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de referencia de anticuerpos Sp35 monoclonales descritos en la presente memoria. Así, según este caso una región variable de la cadena ligera de la descripción tiene secuencias polipeptídicas de CDR1, CDR2 o CDR3 relacionadas con las secuencias polipeptídicas mostradas en la Tabla 5:

40

Tabla 5: Secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL de referencia\*

Hombre del Anticuerpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Li10	P=RASQGIGNWLA (SEQ ID NO:87)	P=AASSLES (SEQ ID NO:89)	P=QQAQIFFLT (SEQ ID NO:91)
	N=OGGGGAGTCAGGG TATTGGCAACTGGTTAGCC (SEQ ID NO:86)	N=GCTGCATCCAAGTTGGAAAAGT (SEQ ID NO:88)	N=CAACAGGCTCAGAC TTTCCCGCTCACC (SEQ ID NO:90)
Li07	P=SCDQLGDKHVA (SEQ ID NO:93)	P=LDIKRFA (SEQ ID NO:95)	P=QAWDIKTV (SEQ ID NO:97)
	N=ICTGGAGATCAGTTG GGTGACAAACATGTGGCT (SEQ ID NO:92)	N=CTAGACATTAAGAGGCCCGCA (SEQ ID NO:94)	N=CAGGCGTGGACATC AAGACGGTC (SEQ ID NO:96)
Li05	P=GGDNIGSKSVH (SEQ ID NO:99)	P=DDYDRPS (SEQ ID NO:101)	P=QVRDSRTEERV (SEQ ID NO:103)
	N=GGGGGAGACAACAT TGGAAGTAAGAGTGTCCAC (SEQ ID NO:98)	N=GATGATTATGACCCGGCOCTCA (SEQ ID NO:100)	N=CAGGTGAGGGACAGCCG TACTGAGGAACGGGTG (SEQ ID NO:102)
Li11	P=RASQEIANYLA (SEQ ID NO:105)	P=DTYTLQT (SEQ ID NO:107)	P=QQADIFPLS (SEQ ID NO:109)
	N=CGGGCGAGTCAGGAG ATTGCCAACTACTTAGCC (SEQ ID NO:104)	N=GATACATACACTTTGCAGACT (SEQ ID NO:106)	N=CAACAGGCTGACATTTT CCCGCTCTCT (SEQ ID NO:108)
Li01	P=QASQDISNYLN (SEQ ID NO:111)	P=DASNLET (SEQ ID NO:113)	P=QQADRFFAVT (SEQ ID NO:115)
	N=CAGGCGAGTCAGGA CATTAGCAACTATTAAAT (SEQ ID NO:110)	N=GATGCATCCAATTTGGAAAACA (SEQ ID NO:112)	N=CAACAGGCTGACAGOTT CCTGGGTCCT (SEQ ID NO:114)



Nombre del Anticuerpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Li06	P=RASQSISSWLA (SEQ ID NO:117)	P=AASSLRT (SEQ ID NO:119)	P=LQDYSYPLT (SEQ ID NO:121)
	N=CGGGCCAGTCAGAGTA TTAGTAGCTGTTGGCC (SEQ ID NO:116)	N=GCTGCAATCCAGTTTACGA (SEQ ID NO:118)	N=CTACAAGATTACAGTTAC CCTCTCACT (SEQ ID NO:120)
Li08	P=QASQDISYYLN (SEQ ID NO:123)	P=DVSNLQT (SEQ ID NO:125)	P=QQSDNLPLT (SEQ ID NO:127)
	N=CAGGCGAGTCAGGAC ATTAGTTACTATTTAAAT (SEQ ID NO:122)	N=GATGTATOCAATTTGCAAACA (SEQ ID NO:124)	N=CAACAGTCTGATA ATCTCCCTCTCACT (SEQ ID NO:126)
Li03	P=RASQSISSYLN (SEQ ID NO:129)	P=AASSLQS (SEQ ID NO:131)	P=QQSYSTPWT (SEQ ID NO:133)
	N=GGCAAGTCAGAGC ATTAGCAGCTATTTAAAT (SEQ ID NO:128)	N=GCTGCAATCCAGTTTCAAAGT (SEQ ID NO:130)	N=CAACAGAGTTACA GTACCCCGTGGACG (SEQ ID NO:132)
Li09	P=RASQSIDTYLN (SEQ ID NO:135)	P=AASKLED (SEQ ID NO:137)	P=QQSYSPPLT (SEQ ID NO:139)
	N=CGCGCAAGTCAGAGC ATCGACACCTATTTAAAT (SEQ ID NO:134)	N=GCTGCAATCCAGTTGGAAGAC (SEQ ID NO:136)	N=CAACAGAGTTACAG TCCCCCTCTCAC (SEQ ID NO:138)
Li02	P=SGDKLQDKFAS (SEQ ID NO:141)	P=QDRKRLS (SEQ ID NO:143)	P=QAWDINTVY (SEQ ID NO:145)
	N=TCTGGAGATAAATTGG GGATAAATTTCTTCC (SEQ ID NO:140)	N=CAAGATAGGAAGCGTCTCTCA (SEQ ID NO:142)	N=CAGGCGTGGGACA CCAACACTGTGGTC (SEQ ID NO:144)
Li13	P=RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:386)	P=DASNRAT (SEQ ID NO:387)	P=QQRSNWPFMYT (SEQ ID NO:388)
Li32	P=QASQDISYYLN (SEQ ID NO:392)	P=DAFILEG (SEQ ID NO:393)	P=QQSDQLPVT (SEQ ID NO:394)
Li33	P=RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:398)	P=DASNRAT (SEQ ID NO:399)	P=QQYDKWPLT (SEQ ID NO:400)
Li34	P=HASQDISNYLS (SEQ ID NO:404)	P=DAFNLET (SEQ ID NO:405)	P=QHYDNLFFT (SEQ ID NO:406)
1A47	P=SASSSVSYM (SEQ ID NO:146)	P=DITSKLAS (SEQ ID NO:147)	P=QQWSSNFFT (SEQ ID NO:148)
2F3	P=RASGNFYNYLA (SEQ ID NO:149)	P=NAKTLPD (SEQ ID NO:150)	P=QHFWAIPYT (SEQ ID NO:151)
3P1D10.2C3	P=KSSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO:152)	P=WASTRES (SEQ ID NO:153)	P=QNDYSYPLFT (SEQ ID NO:154)
3P1E11.3B7	P=KSSQSLNLSGNQKSYLT (SEQ ID NO:155)	P=WASTRES (SEQ ID NO:156)	P=QNDYSYPLFT (SEQ ID NO:157)
Li.a.01	P=SGDSLPSKPVH (SEQ ID NO:234)	P=RDNNRPS (SEQ ID NO:235)	P=SSYDALTD (SEQ ID NO:236)
Li.a.02	P=RASQITNSYLG (SEQ ID NO:237)	P=DASSRAT (SEQ ID NO:238)	P=QQASDAPE (SEQ ID NO:239)
Li.a.03	P=RASQGINFWLN (SEQ ID NO:240)	P=AGSNLQS (SEQ ID NO:241)	P=MQDSDFFP (SEQ ID NO:242)
Li.a.04	P=TGSSNIGAGYDVS (SEQ ID NO:243)	P=RNNRPS (SEQ ID NO:244)	P=QTYDNSTD (SEQ ID NO:245)
Li.a.05	P=SGDNIRSYVH (SEQ ID NO:246)	P=EDSNRPS (SEQ ID NO:247)	P=QSYDSAILLH (SEQ ID NO:248)
Li.a.06	P=RSSQSLVLRGTGYLYN (SEQ ID NO:249)	P=LVSNRAS (SEQ ID NO:250)	P=QYYGMPL (SEQ ID NO:251)
Li.a.07	P=RASQSVSYQYLA (SEQ ID NO:252)	P=GASSRAT (SEQ ID NO:253)	P=QYGSVPR (SEQ ID NO:254)
Li.a.08	P=SGDSLGSYVH (SEQ ID NO:255)	P=DDNDRPS (SEQ ID NO:256)	P=SAYDYSART (SEQ ID NO:257)
Li.a.09	P=SGDNLGSKYVS (SEQ ID NO:258)	P=DDDRPS (SEQ ID NO:259)	P=SSYDFLNIGL (SEQ ID NO:260)
Li.a.10	P=SGDSLQKKS (SEQ ID NO:261)	P=EDSERPS (SEQ ID NO:262)	P=SSYTNVSD (SEQ ID NO:263)
Li.a.11	P=SGDNLGKKYVG (SEQ ID NO:264)	P=DDNDRPS (SEQ ID NO:265)	P=QSYDDTSI (SEQ ID NO:266)
Li.a.12	P=SGDSLGNKYVH (SEQ ID NO:267)	P=DDSDRPS (SEQ ID NO:268)	P=QTDWYVGY (SEQ ID NO:269)

Hombre del Anticuerpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
L1a.13	P=TGTSDDVGGYNYVS (SEQ ID NO:270)	P=DVSNRPS (SEQ ID NO:271)	P=QSYDRYRLKN (SEQ ID NO:272)

\* Determinado por el sistema Kabat (véase anteriormente).

N= secuencia de nucleótidos, P= secuencia polipeptídica.

5 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una VL codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

10 En otro caso, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina en la que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos CDR1, CDR2 y CDR3 mostrados en la Tabla 5. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VL codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

15 En un caso adicional, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina en la que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están codificadas por secuencias de nucleótidos que son idénticas a las secuencias de nucleótidos que codifican los grupos CDR1, CDR2 y CDR3 mostrados en la Tabla 5. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VL codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

20 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VL codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en: 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13) o inhibirá competitivamente la unión de dicho anticuerpo monoclonal a Sp35.

30 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VL codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente a un polipéptido Sp35 o fragmento de éste, o un polipéptido variante Sp35, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) no mayor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ó  $10^{-15}$  M.

35 En un caso adicional, la presente descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una VH al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a una secuencia polipeptídica de VH de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380 y 384 mostradas en la Tabla 6. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VH codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

40 En otro caso, la presente descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica una VH que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380 y 384 mostradas en la Tabla 6. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VH codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

Tabla 6 - Secuencias polipeptídicas de VH

VH	Secuencia	SEQ ID NO:
Li02	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSTYEMIWVRQAPGKGLEWVSSIGP SGGLTWYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCVRIDDSSGW AFDIWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP	158
Li09	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSMYSMVWVRQAPGKGLEWVSYIS PSGGKTMYADSVKGRFTISRDN SKNTFY LQMNSLRAEDTAVYYCARD SRRRY YDFWSGYHNYYYYYMDVWGKGT TTVTSSASTKGPSVFPLAP	159
Li06	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSEYPMDWVRQAPGKGLEWVSSIY SSGGSTVYADSIKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDS DAF DIWGQGTMTVTSSASTKGPSVFPLAP	160
Li05	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSAYAMGWVRQAPGKGLEWVSSIV SSGGYTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDHNA FDIWGQGTMTVTSSASTKGPSVFPLAP	161
Li04	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSRYNMGWVRQAPGKGLEWVSVTY PSGGGTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSIADDAF DIWGQGTMTVTSSASTKGPSVFPLAP	162

VH	Secuencia	SEQ ID NO:
Li08	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYEMVWVRQAPGKGLEWVSSIRS SGGATKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKESPDYF DYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAP	163
Li11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMYWVRQAPGKGLEWVSSIST SGGYTGYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTSDNDY YYMDVWGKGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	164
Li10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYPMVWVRQAPGKGLEWVSWIG PSGGVTAAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYSSGW WDFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP	165
Li01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYQMTWVRQAPGKGLEWVSSIY PSGGNTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGTTEAV FDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAP	166
Li07	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYFMGWVRQAPGKGLEWVSSIS PSGGFTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRHAFD IWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP	167
Li03	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYPMWVRQAPGKGLEWVSGIY PSGGSTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGQWL GDFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAP	168
Li12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYNMFWVRQAPGKGLEWVSRIS SGGMTMYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREALRPY CSGGSCYSYDYGGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	169
1A7	QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGW INTDTGPTYTEDFQGRFAFSLETSASTVYLQFNNLKNEDTATYFCAREGVHF DYWGQGTITVTVSS	170
2F3	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWLDWVRQSPEKGLEWVAEIR SKANNHATNYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYFCTPSFAYW GQGTITVTVSS	171

VH	Secuencia	SEQ ID NO:
3P1D 10.2C 3 y 3P1E 11.3B 7	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCRASGYTFTSSWTQWVKQRPGQGLEWIGAIY PGDGDTRYTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARHNSYG MDYWGQGTSVTVSS	172
Li13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYEMYWVRQAPGKGLEWVSRIV SSGGFTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEGDND FDIWGQGTTVTVSS	372
Li32	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYMMQWVRQAPGKGLEWVSSIS PSGGNTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYGY WFDPWGQGITVTVSS	376
Li33	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYPMFWVRQAPGKGLEWVSWIGP SGGITKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAREGHNDWY FDLWGRGTLVTVSS	380
Li34	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYEMYWVRQAPGKGLEWVSGIY SSGGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAILDW YFDLWGRGTLVTVSS	384

En un caso adicional, la descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una VH al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a una secuencia polipeptídica de VH de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 158-172, 372, 376, 380 y 384.

5 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VH codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

En otro caso, la descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica una VH de la descripción seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 158-172, 372, 376, 380 y 384. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VH codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

10

En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VH codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en: (201') 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13) o inhibirá competitivamente la unión de dicho anticuerpo monoclonal a Sp35.

15

En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VH codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente a un polipéptido Sp35 o fragmento de éste, o un polipéptido variante Sp35, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) no mayor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ó  $10^{-15}$  M.

20

En casos adicionales, la descripción incluye un polinucleótido aislado que codifica una región variable de cadena pesada ( $V_H$ ), en la que el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico de  $V_H$  seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs 173 a 184, 370, 374, 378 y 382, como se muestra en la Tabla 7. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VH codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

30

Tabla 7 - Secuencias polinucleotídicas de VH

VH	Secuencia	SEQ ID NO:
Li02	GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTC TTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTC ACTTTCTCTACTTACGAGATGATTTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCGGTCCTTCTGGT GGCCTTACTTGGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACCGC CATGTATTACTGTGTACGGATTGATGATAGTAGTGGTTGGGCTTTTGATATCTGG GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCGCTAGCACCC	173
Li09	GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTC TTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTC ACTTTCTCTATGTACTCTATGGTTTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTGGAGTGGGTTTCTTATATCTCTCCTTCTGGT GGCAAGACTATGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTTTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACCGC CGTGTATTACTGTGCGAGAGATTGAGACGCCGGTATTACGATTTTGGAGTGGT TATCACAATACTACTACTACTACTACATGGACGCTG GGGCAAAGGGACCACGGTCA CCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	174
Li06	GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTC TTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTC ACTTTCTCTGAGTACCCTATGGATGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTATTCTTCTGGT GGCTCTACTGTTTATGCTGACTCCATTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACCGC CGTGTATTACTGTGCCAGAGAGGGTACTCTGATGCTTTTGA TATCTGGGGCAA GGGACAATGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGC TAGCACCC	175

VH	Secuencia	SEQ ID NO:
Li05	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTGCTTACGCTATGGGTTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCGTTCTTCTGGT GGCTATACTGATTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTGCCAGAGAGGGTGACCATAATGCTTTTGATATCTGGGGCCAA GGGACAATGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGC TAGCACC	176
Li04	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCGTTACAATATGGGTTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGTTATCTATCCTTCTGGT GGCGTACTCATTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGTCTATAGCAGATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAA GGGACAATGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGC TAGCACC	177
Li08	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTATTACGAGATGGTTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCCGTTCTTCTGGT GGCGTACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAAAGAGTCGCCAGACGACTACTTTGACTACTGGGGCCAG GGAACCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGC TAGCACC	178
Li11	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTTCTTACGCTATGATTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTACTTCTGGT GGCTATACTGGTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGAGATAACAGCGATAATGACTACTACTACATGGACGTC TGGGGCAAAGGGACCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCGCTAGCACC	179
Li10	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTACTTACCCTATGGTTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGGATCGGTCCTTCTGGT GGCGTACTGCTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGACCCTATAGCAGTGGCTGGTGGGACTTCGATCTCTGG GGCCGTGGCACCCTGGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCGCTAGCACC	180
Li01	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTAAGTACCAGATGACTTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTATCCTTCTGGT GGCAATACTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGTGGGACTACAGAGGCAGTCTTTGACTACTGGGGCCAG GGAACCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGC TAGCACC	181

VH	Secuencia	SEQ ID NO:
Li07	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTCCTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTCCGGATTCACTTTCTCTATGTACTTTATGGGTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTCCTTCTGGT GGCTTTACTTCTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGC AGTCTACTATTGTGCGAGAGATCGGCATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTAGCAC CC	182
Li03	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTCCTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTCCGGATTCACTTTCTCTCAGTACCCTATGGAGTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGGTATCTATCCTTCTGGT GGCTCTACTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGAGCGGGCAGTGGCTGGGGACTTTGACTACTGGGGC CAGGAACCCTGGTACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CGCTAGCACCC	183
Li12	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTCCTTAC GTCTTTCTTGCGCTGCTCCGGATTCACTTTCTCTCAGTACAATATGTTTGGGT TCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTCGTATCTCTTCTTCTGGT GGCATGATATGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGC TGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGCGTTACGGCCTTATTGTAGTGGTGGTAGTGC TACTCCGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA CCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTAGCACCC	184
Li13	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTCCTTA CGTCTTTCTTGCGCTGCTCCGGATTCACTTTCTCTCATTACGAGATGTATTGG GTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTCGTATCGTTTCTTCT GGTGGCTTTACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTGCTTCACTATCTCTAGA GACAACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGAC ACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAGAGGGTGATAATGATGCTTTTGATATCTGG GGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCAAGC	370
Li32	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTCCTTA CGTCTTTCTTGCGCTGCTCCGGATTCACTTTCTCTGCTTACATGATGCAGTGG GTTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTCCTTCT GGTGGCAATACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTGCTTCACTATCTCTAGA GACAACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGAC ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGATTATGGATACTGGTTCGACCCCTGG GGCCAGGGCACCCTGGTACCGTCTCAAGC	374
Li33	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTCCTTA CGTCTTTCTTGCGCTGCTCCGGATTCACTTTCTCTATTTACCCTATGTTTGG GTTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTGGATCGGTCTTCT GGTGGCATTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTGCTTCACTATCTCTAGA GACAACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGAC ACAGCCACATATTACTGTGCGAGAGAGGGGCATAACGACTGGTACTTCGATCTC TGGGGCCGTGGCACCCCTGGTACCGTCTCAAGC	378
Li34	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTCCTTA CGTCTTTCTTGCGCTGCTCCGGATTCACTTTCTCTAATTACGAGATGTATTGG GTTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGGTATCTATTCTTCT GGTGGCATTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTGCTTCACTATCTCTAGA GACAACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGAC ACGGCCGTGTATTACTGTGCTAGGGCAGCCATCCTCGACTGGTACTTCGATCTC TGGGGCCGTGGCACCCCTGGTACCGTCTCAAGC	382



5 En un caso adicional, la presente descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una VH al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a una secuencia de ácido nucleico de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 173-184, 370, 374, 378 y 382 de la Tabla 7. En determinados casos, el polinucleótido codifica un polipéptido VH que se une específicamente o preferentemente a Sp35.

10 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VH codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en: (201') 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13) o inhibirá competitivamente la unión de dicho anticuerpo monoclonal a Sp35.

15 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VH codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente a un polipéptido Sp35 o fragmento de éste, o un polipéptido variante Sp35, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) no mayor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ó  $10^{-15}$  M.

20

25 En un caso adicional, la presente descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una VL al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a una secuencia polipeptídica VL de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381 y 385, mostradas en la Tabla 8. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VL codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

30 En otro caso, la descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica una VL que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381 y 385, mostradas en la Tabla 8. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VL codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

Tabla 8 - Secuencias Polipeptídicas de VL

VL	Secuencia	SEQ ID NO:
Li02	FYSHSAQYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFASWYQQKAGQSPVLV IFQDRKRLSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTNTVVFG GGTKLTVLGOPKAAP	273
Li09	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSAFVGDRAITCRASQSIDTYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASKLEDGVPSRFRSGSGTDFLTIRSLQPEDFGTYCQSQSYSPPLTFG GGTKVEIKRTVAAP	274
Li06	FYSHSAQDIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPN LLIYAASSLRTGVPSRFRSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQDYSYPLTFG QGKLEIKRTVAAP	275
Li05	FYSHSAQSVLTQPPSVSVAPGQTARISCGGDNIGSKSVHWYQQRPGQAPVLV VYDDYDRPSGIPERFSGSNSGDTAILTTIRVEVGDEADFYCQVRDSRTEERVF GGGKVTVLGQPKAAP	276
Li08	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISYLNWYQQKPGKAPK VLIYDVSNLQTVPSRFRSGSASATDFLTISLQPEDATYYCQQSDNPLPLTFG GGTKVEIKRTVAAP	277
Li11	FYSHSAQDIQMTQSPSSVSAPIGDRVTITCRASQEIANYLAWYQQKPGKAPK LLIYDITYTLQTDVPPRFRSGSGTDFLTISLQPEDTATYFCQQAIFPLSFG GGTKVEIKRTVAAP	278
Li10	FYSHSAQDIQMTQSPSSMSASVGDVTITCRASQGIGNWLAWYQQKPGKAP TLLIYAASSLESQVPSRFTGSGSSSGIDFLTISDLHPEDLATYYCQQAQTFPLT FGGGTRVDLKRVAAP	279
Li01	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPK LLIYDASNLETGVPSRFRSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQADRFPVTF GGGKVEIKRTVAAP	280
Li07	FYSHSAQSELTQPPSVSVSPGQTAITCSGDQLGDKHVAWYQQKPGQSPVLVI YLDIKRPAGISERFSGSNSGNTATLTIRGTQAMDEADYYCQAWDIKTVFGGG TKLTVLSQPKAAP	281
Li03	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSQSYSTPWTFGQ GKVEIKRTVAAP	282
1A7	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWTYDTSK LASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI K	283
2F3	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIYNYLAWFQQKQKSPQLLVYNAK TLPDGVPSRFRSGSGSGTQYFLKINSLQPEDFGSYCQHFVAIPYTFGGGKLE IKR	284
3P1D 10.2C 3	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTINSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLFT FGSGTKLEIR	285
3P1E1 1.3B7	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKSYLTWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTINSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLF TFGSGTKLEIR	286

VL	Secuencia	SEQ ID NO:
Li13	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPMYTFGQGTK LEIK	373
Li32	DIQMTQSPDLSASVGDRTTTCQASQDISYYLNWYQQKPGMAPKLLIYDA FILEGGAPSRFSGSGSGTDFSFITISNLQPEDIATYFCQQSDQLPVTFGQGIKVE IR	377
Li33	DIQMTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQYDKWPLTFGGGKIV EIK	381
Li34	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCCHASQDISNYLSWYQQKPGKAPKLLIYDAF NLETGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDFATYYCQHYDNLPFFIFGPGTRVA IR	385

En un caso adicional, la descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una VL al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a una secuencia polipeptídica de VL de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381 y 385.

5 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VL codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

En otro caso, la descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica una VL de la descripción seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381 y 385. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VL codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

10 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VL codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en: 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13) o inhibirá competitivamente la unión de dicho anticuerpo monoclonal a Sp35.

20 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VL codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente a un polipéptido Sp35 o fragmento de éste, o un polipéptido variante Sp35, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) no mayor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ó  $10^{-15}$  M.

30 En casos adicionales, la descripción incluye un polinucleótido aislado que codifica una región variable de cadena ligera ( $V_L$ ) en el que el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico de  $V_L$  seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs 185 a 194, 371, 375, 379 y 383, como se muestra en la Tabla 9. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la VL codificada por el polinucleótido se une específicamente o preferentemente a Sp35.

Tabla 9 - Secuencias polinucleotídicas de VL

VL	Secuencia	SEQ ID NO:
Li02	TTCTATTCTCACAGTGCACAGTACGAATTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTC CCCAGGACAGACAGCCAGCATCACTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATTG CTTCTTGGTATCAGCAGAAGGCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCACTCTTCAAGAT AGGAAGCGTCTCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTGTTGGAACAC AGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTC AGGCGTGGGACACCAACTGTGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA GGTCAGCCCAAGGCTGCCCC	185
Li09	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATTTGTGGGAGACAGAGTCGCCATCACTTGCCGCGAAGTCAGAGCATCGACA CCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACTCCTGATCTAT GCTGCATCCAAGTTGGAAGACGGGGTCCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGAACTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGAAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGGAACTTACT ACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA	186
Li06	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTA GCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATCTAT GCTGCATCCAGTTTACGAACTGGGGTCCCATCAAGATTCAGGGGCAGTGGATCTGG CACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACGTATT ACTGTCTACAAGATTACAGTTACCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA	187
Li05	TTCTATTCTCACAGTGCACAGAGCGTCTTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGC CCCAGGCCAGACGGCCAGGATTTCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAGAGTG TCACTGGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGGCCCTGTCTGGTCTGTATGATGAT TATGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTGTTGGGACAC GGCCATCCTGACCATCACCAGGGTCAAGTTCGGGGATGAGGCCGACTTTTATTGTC AGGTGAGGGACAGCCGTAAGTCTGAGGAACGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACC GTCTTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCC	188

VL	Secuencia	SEQ ID NO:
Li08	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGTT ACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTAC GATGTATCCAATTTGCAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGCCTGTC GACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCGACATATT ACTGTCAACAGTCTGATAATCTCCCTCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG ATTAACGAACTGTGGCTGCACCA	189
Li11	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTC TGCACCTATAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGAGATTGCCA ACTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT GATACATACACTTTGCAGACTGACGTCCCACCGAGGTTCAAGCGGAGTGGTTCGGG GACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATACTGCAACTTACT TTTGTCAACAGGCTGACATTTTCCCGCTCTCTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA	190
Li10	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTC TGCTTCTGTAGGGGACACAGTCAACATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTGGCA ACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT GCTGCATCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGCGGAGTTC CTCTGGGATAGATTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGCACCCTGAAGATTTGGCAA CTTACTATTGTCAACAGGCTCAGACTTTCCCGCTCACCTTCGGCGGAGGGACCAGG GTGGACCTCAAGCGAACTGTGGCTGCACCA	191
Li01	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCA ACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAC GATGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTACT ATTGTCAACAGGCTGACAGGTTCCCTGCGGTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA	192
Li07	TTCTATTCTCACAGTGCACAGAGCGAATTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTC CCCAGGACAGACAGCCATCATCACCTGCTCTGGAGATCAGTTGGGTGACAAACATG TGGCTTGGTATCAACAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCACTATCTAGAC ATTAAGAGGCCCGCAGGGATTTCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTGGAATAC AGCCACTCTGACCATCAGAGGGACCAGGCTATGGATGAAGCTGACTATTACTGTC AGGCGTGGGACATCAAGACGGTCTTCCGGCGGGGGACCAAGCTGACCGTCTGAGT CAGCCCAAGGCTGCCCCC	193
Li03	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCA GCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT GCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACT ACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA	194
Li13	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCA ACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC ACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAAGTTTACTGTGACAGCGTAG CAACTGGCCGATGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA	371

VL	Secuencia	SEQ ID NO:
Li32	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAAGACATTAGCTACTATTTAAATTGGTATCA GCAGAAACCAGGGATGGCCCTAAACTCCTCATCTACGATGCCTTCATTTTGGAA GGAGGGGCCCATCACGGFTCAGTGGGAGGGCTCTGGGACAGATTTTTCTTTCA CCATCAGCAATCTACAGCCTGAGGATATTGCAACTTATTTCTGTCAACAGTCTGA TCAACTGCCCGTGACCTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAGA	375
Li33	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAG CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCA ACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC ACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAGGATTTTGAGTTTATTACTGTGAGCAGTATGA TAAGTGGCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA	379
Li34	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCATGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAAGTTGGTATCA GCAGAAACCAGGTAAGCCCTAAACTCCTGATCTACGATGCTTTCATTTGGAG ACAGGAGTCCCATCGAGGTTCAAGTGGAGTGGATCTGGCACAGATTTTACATTCA CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACATATTACTGTGAGCACTATGA TAATCTCCATTCACITTCGGCCCTGGGACCAGAGTGGCGATCAGA	383

5 En un caso adicional, la descripción incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una VL al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a un polinucleótido VL seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 185-194, 371, 375, 379 y 383 de la Tabla 9. En determinados casos, el polinucleótido codifica un polipéptido VL que se une específicamente o preferentemente a Sp35.

10 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VL codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en: 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13) o inhibirá competitivamente la unión de dicho anticuerpo monoclonal a Sp35.

15 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una VL codificada por uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente a un polipéptido Sp35 o fragmento de éste, o un polipéptido variante Sp35, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) no mayor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ó  $10^{-15}$  M.

20 Cualquiera de los polinucleótidos descritos anteriormente puede incluir además ácidos nucleicos adicionales que codifican, por ejemplo, un péptido señal para dirigir la secreción del polipéptido codificado, regiones constantes de anticuerpo como se describe en la presente memoria, u otros polipéptidos heterólogos como se describe en la presente memoria.

25 También, como se describe con más detalle en otro lugar de la presente memoria, la descripción incluye composiciones que comprenden los polinucleótidos que comprenden uno o más de los polinucleótido descritos anteriormente. En un caso, la descripción incluye composiciones que comprenden un primer polinucleótido y segundo polinucleótido en el que dicho primer polinucleótido codifica un polipéptido VH como se describe en la presente memoria y en el que dicho segundo polinucleótido codifica un polipéptido VL como se describe en la presente memoria. Específicamente, una composición que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polinucleótido VH, como se muestra en la Tabla 7 y un polinucleótido VL, como se muestra en la Tabla 9, en el que dicho polinucleótido VH y dicho polinucleótido VL se seleccionan del grupo que consiste en:

- i) SEQ ID NO: 173 y SEQ ID NO: 185;  
 ii) SEQ ID NO: 174 y SEQ ID NO: 186;  
 iii) SEQ ID NO: 175 y SEQ ID NO: 187;  
 iv) SEQ ID NO: 176 y SEQ ID NO: 188;  
 5 v) SEQ ID NO: 178 y SEQ ID NO: 189;  
 vi) SEQ ID NO: 179 y SEQ ID NO: 190;  
 vii) SEQ ID NO: 180 y SEQ ID NO: 191;  
 viii) SEQ ID NO: 181 y SEQ ID NO: 192;  
 ix) SEQ ID NO: 182 y SEQ ID NO: 193;  
 10 x) SEQ ID NO: 183 y SEQ ID NO: 194;  
 xi) SEQ ID NO: 370 y SEQ ID NO: 371;  
 xii) SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375;  
 xiii) SEQ ID NO: 378 y SEQ ID NO: 379; y  
 xiv) SEQ ID NO: 382 y SEQ ID NO: 385.
- 15 La presente descripción también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la descripción descritos en otro lugar. Además, los polinucleótidos que codifican polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en la presente memoria, también están contemplados por la descripción.
- Los polinucleótidos pueden producirse o fabricarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia nucleotídica del anticuerpo es conocida, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier *et al.*, *BioTechniques* 17: 242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridar y ligar estos oligonucleótidos y amplificar los oligonucleótidos ligados por PCR.
- 20 Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste puede generarse a partir de un ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A+, aislado a partir de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo u otro anticuerpo Sp35, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) por amplificación con PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular que se quiere identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo u otro anticuerpo Sp35. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método muy conocido en la técnica.
- 25 30 35 Una vez que se ha determinado la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, su secuencia de nucleótidos puede manipularse usando métodos muy conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) y Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.
- 40 45 Un polinucleótido que codifica un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo Sp35 o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste puede estar compuesto por ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de

regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo Sp35 o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste puede estar compuesto por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo Sp35 o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste también puede contener una o más bases modificadas o núcleos de ADN o ARN modificados para estabilidad o para otras razones. Bases "modificadas" incluye, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Pueden hacerse una variedad de modificaciones en el ADN y ARN; así, "polinucleótido" engloba las formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente.

Puede crearse un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, una parte de cadena pesada o parte de cadena ligera de inmunoglobulina) introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse por técnicas estándar, tal como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, se hacen sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales.

#### V. Polipéptidos de anticuerpos Sp35

La presente descripción está dirigida además a polipéptidos aislados que componen los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos. Los anticuerpos Sp35 de la presente descripción comprenden polipéptidos, por ejemplo secuencias de aminoácidos que codifican regiones de unión a antígeno específicas de Sp35 derivadas de moléculas de inmunoglobulina. Una secuencia polipeptídica o de aminoácidos "derivada de" una proteína designada se refiere al origen del polipéptido. En determinados casos, la secuencia polipeptídica o de aminoácidos que deriva de una secuencia polipeptídica o de aminoácidos de partida particular tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a la de la secuencia de partida, o una parte de ésta, en el que la parte consiste en al menos 10-20 aminoácidos, al menos 20-30 aminoácidos, al menos 30-50 aminoácidos o que un experto en la técnica puede identificar de otra manera que tiene su origen en la secuencia de partida.

En un caso, la descripción proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina, en la que al menos una de las CDR de la región variable de cadena pesada o al menos dos de las CDR de la región variable de cadena pesada son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas a las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada de referencia de anticuerpos Sp35 monoclonales descritos en la presente memoria. Alternativamente, las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas a las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de referencia de anticuerpos Sp35 monoclonales descritos en la presente memoria. Así, según este caso una región variable de cadena pesada de la descripción tiene secuencias polipeptídicas de CDR1, CDR2 y CDR3 relacionadas con los grupos mostrados en la Tabla 4, más arriba. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende el polipéptido VH se une específicamente o preferentemente a Sp35.

En otro caso, la descripción proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina, en la que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos CDR1, CDR2 y CDR3 mostrados en la Tabla 4. En determinados casos, un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno que comprende el polipéptido VH se une específicamente o preferentemente a Sp35.

En un caso adicional, la descripción incluye un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido VH al menos 80%, 85%, 90%, 95% ó 100% idéntico a una secuencia polipeptídica VH de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380 y 384 como se muestra en la Tabla 6. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende el polipéptido VH se une específicamente o preferentemente a Sp35.

En otro caso, la descripción incluye un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido VH seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380 y 384 como se muestra en la Tabla 6. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende el polipéptido VH se une específicamente o preferentemente a Sp35.

En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en uno o más de los polipéptidos VH descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-



E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13) o inhibirá competitivamente la unión de dicho anticuerpo monoclonal a Sp35.

5 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en uno o más de los polipéptidos VH descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente a un polipéptido Sp35 o fragmento de éste, o un polipéptido Sp35 variante, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) no mayor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ó  $10^{-15}$  M.

10 En otro caso, la descripción proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina, en la que al menos una de las CDR de la región variable de cadena ligera o al menos dos de las CDR de la región variable de cadena ligera son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas a las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada de referencia de anticuerpos Sp35 monoclonales descritos en la presente memoria. Alternativamente, las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas a las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de referencia de anticuerpos Sp35 monoclonales descritos en la presente memoria. Así, según este caso una región variable de cadena ligera de la descripción tiene secuencias polipeptídicas de CDR1, CDR2 y CDR3 relacionadas con los polipéptidos mostrados en la Tabla 5, más arriba. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende el polipéptido VL se une específicamente o preferentemente a Sp35.

15 En otro caso, la descripción proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina, en la que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos CDR1, CDR2 y CDR3 mostrados en la Tabla 5. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende el polipéptido VL se une específicamente o preferentemente a Sp35.

20 En un caso adicional, la descripción incluye un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido VL al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idéntico a una secuencia polipeptídica VL de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381 y 385, mostrado en la Tabla 8. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende el polipéptido VL se une específicamente o preferentemente a Sp35.

25 En otro caso, la presente descripción incluye un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido VL seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381 y 385, mostrado en la Tabla 8. En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende el polipéptido VL se une específicamente o preferentemente a Sp35.

30 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en uno o más de los polipéptidos VL descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) y 1968 (L1a.13) o inhibirá competitivamente la unión de dicho anticuerpo monoclonal a Sp35.

35 En determinados casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende, consiste esencialmente en o consiste en uno o más de los polipéptidos VL descritos anteriormente se une específicamente o preferentemente a un polipéptido Sp35 o fragmento de éste, o un polipéptido Sp35 variante, con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) no mayor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ó  $10^{-15}$  M.

40 En otros casos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido VH, como se muestra en la Tabla 6, y un polipéptido VL, como se muestra en la Tabla 8, seleccionado del grupo que consiste en:

- i) SEQ ID NO: 170 y SEQ ID NO: 283;
- ii) SEQ ID NO: 171 y SEQ ID NO: 284;
- iii) SEQ ID NO: 172 y SEQ ID NO: 285;
- iv) SEQ ID NO: 172 y SEQ ID NO: 286;
- 5 v) SEQ ID NO: 158 y SEQ ID NO: 273;
- vi) SEQ ID NO: 159 y SEQ ID NO: 274;
- vii) SEQ ID NO: 160 y SEQ ID NO: 275;
- viii) SEQ ID NO: 161 y SEQ ID NO: 276;
- ix) SEQ ID NO: 163 y SEQ ID NO: 277;
- 10 x) SEQ ID NO: 164 y SEQ ID NO: 278;
- xi) SEQ ID NO: 165 y SEQ ID NO: 279;
- xii) SEQ ID NO: 166 y SEQ ID NO: 280;
- xiii) SEQ ID NO: 167 y SEQ ID NO: 281;
- xiv) SEQ ID NO: 168 y SEQ ID NO: 282;
- 15 xv) SEQ ID NO: 372 y SEQ ID NO: 373;
- xvi) SEQ ID NO: 376 y SEQ ID NO: 377;
- xvii) SEQ ID NO: 380 y SEQ ID NO: 381; y
- xviii) SEQ ID NO: 384 y SEQ ID NO: 385.

20 Cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente puede incluir además polipéptidos adicionales, por ejemplo, un péptido señal para dirigir la secreción del polipéptido codificado, regiones constantes de anticuerpo como se describe en la presente memoria u otros polipéptidos heterólogos como se describe en la presente memoria. Además, los polipéptidos de la descripción incluyen fragmentos de polipéptidos como se describe en otro lugar. Además, los polipéptidos de la descripción incluyen polipéptidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en la presente memoria.

25 También, como se describe con más detalle en otro lugar de la presente memoria, la descripción incluye composiciones que comprenden los polipéptidos descritos anteriormente.

30 Un experto en la técnica también entenderá que los polipéptidos de anticuerpo Sp35 como se describe en la presente memoria pueden modificarse de manera tal que varíen en la secuencia de aminoácidos respecto al polipéptido de unión natural del que derivan. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o de aminoácidos derivada de una proteína designada puede ser similar, por ejemplo, tener un porcentaje de identidad determinado respecto a la secuencia de partida, por ejemplo, puede ser 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de partida.

35 Además, pueden hacerse sustituciones, deleciones o inserciones de nucleótidos o aminoácidos que dan lugar a sustituciones o cambios conservativos en regiones de aminoácidos "no esenciales". Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o de aminoácidos derivada de una proteína designada puede ser idéntica a la secuencia de partida excepto por una o más sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos individuales, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, quince, veinte o más sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos individuales. En determinados casos, una secuencia polipeptídica o de aminoácidos derivada de una proteína designada tiene una a cinco, una a diez, una a quince o una a veinte sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos individuales respecto a la secuencia de partida.

40 Determinados polipéptidos de anticuerpo Sp35 de la descripción comprenden, consisten esencialmente en o consisten en una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos humana. Sin embargo, determinados polipéptidos de anticuerpo Sp35 comprenden uno o más aminoácidos contiguos derivados de otra especie de mamíferos. Por ejemplo, un anticuerpo Sp35 de la descripción puede incluir una parte de cadena pesada, parte de bisagra o región de unión a antígeno de primate. En otro ejemplo, uno o más aminoácidos derivados de murino pueden

estar presentes en un polipéptido de anticuerpo no murino, por ejemplo, en un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo Sp35. En determinadas aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos específicos de Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o análogos de éstos se diseñan de manera que no sean inmunogénicos en el animal al que se administra el anticuerpo.

5 En determinados casos, un polipéptido de anticuerpo Sp35 comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos que normalmente no están asociados con un anticuerpo. Las modificaciones ejemplares se describen con más detalle más adelante. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo fv de cadena única de la descripción puede comprender una secuencia conectora flexible, o puede estar modificado para añadir un resto funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina o un marcaje).

10 Un polipéptido de anticuerpo Sp35 de la descripción puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas químéricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión diana y al menos una parte heteróloga, es decir, una parte con la que no está unida naturalmente en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se ponen en contacto en el polipéptido de fusión o que pueden existir normalmente en la misma proteína pero están situadas en una nueva reorganización en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión pueden crearse, por ejemplo, por síntesis química o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones del péptido están codificadas en la relación deseada.

15 El término "heterólogo" según se aplica a un polinucleótido o un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido deriva de una entidad distinta de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, tal y como se usa en la presente memoria, un "polipéptido heterólogo" que se va a fusionar a un anticuerpo Sp35, o un fragmento de unión a antígeno, variante o análogo de éste deriva de un polipéptido no de inmunoglobulina de la misma especie o un polipéptido de inmunoglobulina o no de inmunoglobulina de una especie diferente.

20 Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina se reemplaza preferiblemente por otro residuo de aminoácido de la familia con la misma cadena lateral. En otro caso, una cadena de aminoácidos puede reemplazarse por una cadena estructuralmente similar que se diferencia en el orden y/o composición de los miembros de la familia de cadena lateral.

25 Alternativamente, en otro caso, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificadora de la inmunoglobulina, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden incorporarse en anticuerpos Sp35 para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria y cribarse para su capacidad de unirse al antígeno deseado, por ejemplo, Sp35.

#### VI. Proteínas de fusión y conjugados de anticuerpos

30 Como se discute con más detalle en otro lugar de la presente memoria, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden fusionarse además recombinantemente a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos Sp35 específicos de Sp35 pueden fusionarse o conjugarse recombinantemente a moléculas útiles como etiquetas en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véase, por ejemplo, publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente U.S. No. 5.314.995; y EP 396.387.

35 Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción incluyen derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de manera que la unión covalente no evite que el anticuerpo se una a Sp35. Por ejemplo, pero no como limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede llevarse a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitado a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los anticuerpos específicos de Sp35 pueden modificarse por procesos naturales, tales como procesamiento posterior a la traducción, o por técnicas de modificación química que son muy conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una bibliografía de investigación voluminosa. Las modificaciones pueden producirse en cualquier lugar en el anticuerpo específico de Sp35, incluyendo el núcleo peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y el extremo amino o carboxi, o en restos tales como carbohidratos. Se apreciará que puede estar presente el mismo tipo de modificación en el mismo grado o grados distintos en varios sitios en un anticuerpo específico de Sp35 dado. También, un anticuerpo específico de Sp35 dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos específicos de Sp35 pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los anticuerpos específicos de Sp35 cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales posteriores a la traducción o pueden prepararse por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York, 2ª Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth Enzymol* 182: 626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 663: 48-62 (1992)).

La presente descripción también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste y un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo al que se fusiona el anticuerpo puede ser útil para la función o es útil para tomar como diana las células que expresan el polipéptido Sp35. En un caso, una proteína de fusión de la descripción comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones V<sub>H</sub> de un anticuerpo de la descripción o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones V<sub>L</sub> de un anticuerpo de la descripción o fragmentos o variantes de éstos, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En otro caso, una proteína de fusión para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres de las CDR de V<sub>H</sub> de un anticuerpo específico de Sp35, o fragmentos, variantes o derivados de éste, o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres de las CDR de V<sub>L</sub> de un anticuerpo específico de Sp35, o fragmentos, variantes o derivados de éste, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En un caso, la proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de V<sub>H</sub> de un anticuerpo específico de Sp35 de la presente descripción, o fragmento, derivado o variante de éste, y una secuencia polipeptídica heteróloga, en el que la proteína de fusión se une específicamente al menos a un epítipo de Sp35. En otro caso, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región de V<sub>H</sub> de un anticuerpo específico de Sp35 de la descripción y la secuencia de aminoácidos de al menos una región de V<sub>L</sub> de un anticuerpo específico de Sp35 de la descripción o fragmentos, derivados o variantes de éstos y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la proteína de fusión corresponden a una única fuente de anticuerpo (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente al menos a un epítipo de Sp35. En otro caso adicional, una proteína de fusión para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las CDR de V<sub>H</sub> de un anticuerpo específico de Sp35 y secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las CDR de V<sub>L</sub> de un anticuerpo específico de Sp35, o fragmentos o variantes de éste, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las CDR de V<sub>H</sub> o CDR de V<sub>L</sub> corresponden a una única fuente de anticuerpo (o fragmento scFv o Fab) de la descripción. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también están englobadas por la descripción.

Las proteínas de fusión ejemplares reportadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2936-2940 (1987)); CD4 (Capon *et al.*, *Nature* 337: 525-531 (1989); Traunecker *et al.*, *Nature* 339: 68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, *DNA Cell Biol. USA* 9: 347-353 (1990); y Byrn *et al.*, *Nature* 344: 667-670 (1990)); L-selectina (receptor de direccionamiento) (Watson *et al.*, *J. Cell. Biol.* 110: 2221-2229 (1990); y Watson *et al.*, *Nature* 349: 164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*, *Cell* 61: 1303-1313 (1990)); CD28 y B7 (Linsley *et al.*, *J. Exp. Med* 173: 721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, *J. Exp. Med.* 174: 561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, *Cell* 66: 1133-1144 (1991)); receptor de TNF (Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 27: 2883-2886 (1991); y Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.* 174: 1483-1489 (1991)); y receptor de IgE (Ridgway y Gorman, *J. Cell. Biol. Vol.* 115, Resumen No. 1448 (1991)).

En determinados casos, los anticuerpos Sp35, fragmentos de anticuerpo, derivados y variantes de éstos comprenden además un resto de direccionamiento. Los restos de direccionamiento incluyen una proteína o un péptido que dirige la localización a una parte determinada del cuerpo, por ejemplo, al cerebro o compartimentos de éste. En determinados casos, los anticuerpos Sp35, fragmentos de anticuerpo, derivados y variantes de éstos se unen o fusionan a un resto de direccionamiento cerebral. Los restos de direccionamiento cerebral están unidos covalentemente (por ejemplo, fusión directa de traducción o por unión química bien directamente o a través de una molécula espaciadora, que puede ser opcionalmente escindible) o unidos no covalentemente (por ejemplo, a través de interacciones reversibles tales como avidina, biotina, proteína A, IgG, etc.). En otros casos, los anticuerpos Sp35, fragmentos de anticuerpo, derivados y variantes de éstos están unidos a uno o más restos de direccionamiento cerebral. En casos adicionales, el resto de direccionamiento cerebral está unido a una pluralidad de anticuerpos Sp35, fragmentos de anticuerpo, derivados y variantes de éstos.

Un resto de direccionamiento cerebral asociado con un anticuerpo Sp35, fragmento de anticuerpo, derivado o variante de éste aumenta la administración cerebral de dichos anticuerpos Sp35, fragmentos de anticuerpo, derivados y variantes de éstos. Se han descrito varios polipéptidos que, cuando se fusionan con una proteína o agente terapéutico, administran la proteína o agente terapéutico a través de la barrera hematoencefálica (BBB). Los ejemplos no limitativos incluyen el anticuerpo de dominio único FC5 (Abulrob *et al.* (2005) *J. Neurochem.* 95, 1201-1214); mAB 83-14, un anticuerpo monoclonal frente al receptor de insulina humano (Pardridge *et al.* (1995) *Pharmacol. Res.* 12, 807-816); los péptidos B2, B6 y B8 que se unen al receptor de transferrina humano (hTfR) (Xia *et al.* (2000) *J. Virol.* 74, 11359-11366); el anticuerpo monoclonal OX26 frente al receptor de transferrina (Pardridge *et al.* (1991) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 66-70); y SEQ ID NOs: 1-18 de la Patente U.S. No. 6.306.365.

La administración cerebral aumentada de un anticuerpo Sp35, fragmento de anticuerpo, derivado o variante de éste se determina por varios medios bien establecidos en la técnica. Por ejemplo, administración a un animal de un anticuerpo Sp35, fragmento de anticuerpo, derivado y variante de éste marcado con radiactividad, enzimáticamente o fluorescentemente, unido a un resto de direccionamiento cerebral; determinación de la localización cerebral; y comparación de la localización con un anticuerpo Sp35, fragmento de anticuerpo, derivado o variante de éste marcado con radiactividad, enzimáticamente o fluorescentemente equivalente que no está asociado con un resto de direccionamiento cerebral. Otros medios para determinar el direccionamiento aumentado se describen en las referencias anteriores.

Como se discute en otro lugar de la presente memoria, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados éstos de la descripción pueden fusionarse a polipéptidos heterólogos para incrementar la vida media *in vivo* de los polipéptidos o para uso en métodos que usan inmunoensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un caso, puede conjugarse PEG con los anticuerpos Sp35 de la descripción para incrementar su vida media *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, *Cytokine* 16: 106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54: 531 (2002); o Weir *et al.*, *Biochem. Soc. Transactions* 30: 512 (2002).

Además, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados éstos de la descripción pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En casos preferidos, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otras, muchas de las cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no están limitadas a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984)) y la etiqueta "flag".

Las proteínas de fusión pueden prepararse usando métodos que son muy conocidos en la técnica (véase por ejemplo las Patentes US Nos. 5.116.964 y 5.225.538). El sitio preciso en el que se hace la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de secreción o unión de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión se transfiere a una célula huésped para expresión.

Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la presente descripción pueden usarse en forma no conjugada o pueden conjugarse con al menos una de una variedad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de la diana, o para formación de imágenes o terapia del paciente. Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden marcarse o conjugarse bien antes o después de la purificación, cuando se realiza purificación.

En particular, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

Los expertos en la técnica apreciarán que los conjugados también pueden ensamblarse usando una variedad de técnicas dependiendo del agente seleccionado que se va a conjugar. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión con un éster activado de biotina tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. De manera similar, los conjugados con un marcador fluorescente pueden prepararse en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, aquellos listados en la presente memoria, o por reacción con un isotiocianato, preferiblemente fluoresceína-isotiocianato. Los conjugados de los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción se preparan de una manera análoga.

La presente descripción engloba además anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos Sp35 pueden usarse para diagnóstico, por ejemplo, para monitorizar el desarrollo o progresión de una enfermedad neurológica como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un tratamiento y/o régimen de prevención dado. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones usando varias tomografías de emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, Pat. U.S. No. 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnósticos según la presente descripción. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuado incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y acurina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{99}\text{Tc}$ .

Un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste también puede marcarse de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo Sp35 etiquetado con quimioluminiscencia se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Una de las formas en las que un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste puede marcarse de forma detectable es uniendo el mismo a una enzima y usando el producto unido en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quaterly Publication, Walkersville, Md., *Diagnostic Horizons* 2: 1-7 (1978)); Voller *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 31: 507-520 (1978); Butler, J.E., *Meth. Enzymol.* 73: 482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. *et al.*, (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kigaku Shoin, Tokio (1981). La enzima, que está unida al anticuerpo Sp35 reaccionará con un sustrato apropiado, preferiblemente un sustrato cromogénico, de tal manera que produce un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar de forma detectable el anticuerpo incluyen, pero no están limitadas a, malato deshidrogenasa, nucleasa estaphylococcal, isomerasa delta-5-esteroide, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Además, la detección puede conseguirse por métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede conseguirse por comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de manera similar.

La detección también puede conseguirse usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiativamente el anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de 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 medios que incluyen, pero no están limitados a, un contador gamma, un contador de centelleo o autorradiografía.

Un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste también puede marcarse de forma detectable usando metales que emiten fluorescencia tales como  $^{152}\text{Eu}$ , u otros de la serie lantánido. Estos metales pueden unirse al anticuerpo usando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Las técnicas para conjugar varios restos a un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste son muy conocidas, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.),

Marcel Dekker, Inc., p. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchers *et al.* (eds.), p. 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 *et al.* (eds.), Academic Press p. 303-16 (1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982).

#### VII. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

Como es bien conocido, el ARN puede aislarse de las células de hibridoma originales o de otras células transformadas por técnicas estándar, tales como extracción con isotiocianato de guanidinio y precipitación seguido de centrifugación o cromatografía. Cuando es deseable, el ARNm puede aislarse del ARN total por técnicas estándar tales como cromatografía en oligo dT celulosa. Las técnicas adecuadas son familiares en la técnica.

En un caso, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo pueden prepararse, bien simultáneamente o separadamente, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa según métodos muy conocidos. La PCR puede iniciarse con cebadores de región constante consenso o con cebadores más específicos basados en las secuencias publicadas de ADN y aminoácidos de la cadena pesada y ligera. Como se ha discutido anteriormente, la PCR también puede usarse para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. En este caso, las bibliotecas pueden cribarse con cebadores consenso o sondas homólogas mayores, tales como sondas de región constante de ratón.

El ADN, típicamente ADN plasmídico, puede aislarse de las células usando técnicas conocidas en la técnica, mapearse por restricción y secuenciarse según técnicas estándar muy conocidas mostradas con detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores referentes a técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético según la presente descripción en cualquier punto durante el proceso de aislamiento o análisis posterior.

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos Sp35 se insertan típicamente en un vector de expresión para introducción en células huésped que pueden usarse para producir la cantidad deseada de anticuerpo Sp35.

La expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo de éste, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana descrita en la presente memoria, por ejemplo, Sp35, requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o parte de éste (que preferiblemente contiene el dominio variable de cadena pesada o ligera) de la descripción, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas muy conocidas en la técnica. Así, los métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo se describen en la presente memoria. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo y señales apropiadas de control de la transcripción y traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La descripción proporciona así vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la descripción, o una cadena pesada o ligera de éste, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unida de manera operativa a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 86/05807; Publicación PCT WO 89/01036; y la Pat. U.S. No. 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para expresión de la cadena pesada o ligera completa.

La célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la descripción, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la misma expresión de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica los dos polipéptidos, de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se sitúa ventajosamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322: 52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2197 (1980)). Las secuencias codificadoras para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en la presente memoria para significar vectores usados según la descripción como un vehículo para introducir en y expresar un gen deseado en una célula huésped. Como conocen los expertos en la técnica, dichos vectores pueden seleccionarse fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la descripción comprenderán un marcador de selección, sitios

de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Para los propósitos de esta descripción, pueden emplearse numerosos sistemas de vectores de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que derivan de virus animales tales como virus de papiloma bovino, virus de polioma, adenovirus, virus de vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión a ribosomas internos. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas pueden seleccionarse introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de las células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped auxótrofo, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tal como cobre. El gen del marcador seleccionable pueden unirse directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducirse en la misma célula por cotransformación. También pueden necesitarse elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores, potenciadores y señales de terminación de la transcripción.

En casos particularmente preferidos, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (preferiblemente humanos) sintéticos como se ha discutido anteriormente. En un caso, esto se efectúa usando un vector de expresión patentado de Biogen IDEC, Inc., referido como NEOSPLA (patente U.S. 6.159.730). Este vector contiene el promotor/potenciador de citomegalovirus, el promotor principal de beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, el exón 1 y exón 2 de la neomicina fosfotransferasa, el gen de la dihidrofolato reductasa y secuencia líder. Se ha encontrado que este vector resulta en un nivel de expresión muy alto de anticuerpos después de la incorporación de los genes de la región variable y constante, transfección en células CHO, seguido de selección en medio que contiene G418 y amplificación con metotrexato. Por supuesto, puede usarse en la presente descripción cualquier vector de expresión que sea capaz de incitar la expresión en células eucariotas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no están limitados a, los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA) y el plásmido pCI (disponible en Promega, Madison, WI). En general, el cribado de grandes números de células transformadas para aquellas que expresan niveles adecuadamente altos de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina es experimentación rutinaria que puede llevarse a cabo, por ejemplo, con sistemas robóticos. Los sistemas de vectores también se enseñan en las Pat. U.S. Nos. 5.736.137 y 5.658.570. Este sistema proporciona altos niveles de expresión, por ejemplo, > 30 pg/célula/día. Otros sistemas de vectores ejemplares se describen, por ejemplo, en Patente U.S. 6.413.777.

En otros casos preferidos, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden expresarse usando construcciones policistrónicas tales como las descritas en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2003-0157641 A1, presentada el 18 de noviembre, 2002. En estos sistemas nuevos de expresión, pueden producirse múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de una única construcción policistrónica. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos Sp35, por ejemplo, polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos específicos de Sp35 o fragmentos inmunoespecíficos de éstos en células huésped eucariotas. Las secuencias IRES compatibles se describen en Pat. U.S. No. 6.193.980. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos sistemas de expresión pueden usarse para producir eficazmente el rango completo de anticuerpos Sp35 descrito en la presente solicitud.

Más generalmente, una vez que se ha preparado el vector o secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo Sp35, el vector de expresión puede introducirse en una célula huésped apropiada. La introducción del plásmido en la célula huésped puede conseguirse por varias técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica. Éstas incluyen, pero no están limitadas a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN recubierto, microinyección e infección con virus intactos. Véase, Ridgway, A.A.G. "*Mammalian Expression Vectors*" Vectors, Rodriguez y Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., Capítulo 24.2, p. 470-472 (1988). Típicamente, la introducción de plásmidos en el huésped es mediante electroporación. Las células huésped que albergan la construcción de expresión se crecen en condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y cadenas pesadas y se ensayan para la síntesis de proteínas de cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo ejemplares incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de separación celular activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y semejantes.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para uso en los métodos descritos en la presente memoria. Así, la descripción incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la descripción o una cadena pesada o ligera de éste, unido de manera operativa a un promotor heterólogo.



En casos preferidos para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican tanto las cadenas pesada como ligera pueden co-expresarse en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla más adelante.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, "células huésped" se refiere a células que albergan vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procesos para el aislamiento de anticuerpos a partir de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo a no ser que se especifique claramente otra cosa. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar bien a partir de la centrifugación de las células completas o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

10 Puede utilizarse una variedad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar moléculas de anticuerpo para uso en los métodos descritos en la presente memoria. Dichos sistemas huésped-expresión representan vehículos por los cuales las secuencias codificadoras de interés pueden producirse y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de nucleótidos codificadoras apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la descripción *in situ*. Éstas incluyen pero no están limitadas a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia). Preferiblemente, se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor principal del gen intermedio temprano de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, *Gene* 45: 101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8: 2 (1990)).

La línea celular huésped usada para la expresión de proteínas tiene frecuentemente un origen animal; los expertos en la técnica están acreditados con la capacidad de determinar preferentemente las líneas celulares huésped particulares que son las más adecuadas para que se exprese en ellas el producto génico deseado. Las líneas celulares huésped ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, CHO (Ovario de Hámster Chino), DG44 y DUXB11 (líneas de Ovario de Hámster Chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón de cría de hámster), MDCK 293, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Se prefieren particularmente las células CHO. Las líneas celulares huésped están típicamente disponibles en servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection o en la bibliografía publicada.

Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas o que modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación posteriores a la traducción de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico.

Para la producción con alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden prepararse por ingeniería líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, las células preparadas por ingeniería se crecen durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse

ventajosamente para preparar por ingeniería líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo pero no limitado a los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, *Cell* 11: 223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 202 (1992)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell* 22: 817 (1980)) pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También, puede usarse resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77: 357 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); *TIB TECH* 11(5): 155-215 (mayo, 1993); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, *Gene* 30: 147 (1984)). Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150: 1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden incrementarse por amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells* en *DNA cloning*, Academic Press, Nueva York, Vol. 3. (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el incremento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped incrementará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada con el gen de anticuerpo, también se incrementará la producción del anticuerpo (Crouse *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3: 257 (1983)).

La producción *in vitro* permite el aumento de escala para proporcionar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo tisular son conocidas en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogéneo, por ejemplo, en un reactor aireado o en un reactor con agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas o microlechos de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o se desea, las disoluciones de polipéptidos pueden purificarse por los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno-)afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis preferente de un polipéptido sintético de la región bisagra o antes de o posteriormente a la etapa de cromatografía HIC descrita en la presente memoria.

Los genes que codifican los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción también pueden expresarse en células no de mamífero tales como células de bacterias o levaduras o plantas. Las bacterias que captan fácilmente ácidos nucleicos incluyen miembros de las enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Además se apreciará que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos típicamente se vuelven parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos deben aislarse, purificarse y ensamblarse en moléculas funcionales. Cuando se desean formas tetravalentes de anticuerpos, las subunidades se auto-ensamblarán en anticuerpos tetravalentes (WO02/096948A2).

En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se quiere producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no están limitados a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, *EMBO J.* 2: 1791 (1983)), en el que la secuencia codificadora del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificadora lacZ de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509 (1989)); y semejantes. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas por adsorción y unión a una matriz de glutatión-lechos de agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la proteasa trombina o factor Xa de manera que el producto génico diana clonado puede liberarse del resto GST.

Además de los procariotas, también pueden usarse microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el usado más comúnmente entre los microorganismos eucariotas aunque varias cepas adicionales están disponibles comúnmente, por ejemplo, *Pichia pastoris*.

Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa comúnmente el plásmido YRp7, por ejemplo (Stinchcomb, *et al.*, *Nature* 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene* 7: 141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene* 10: 157 (1980)). Este plásmido contiene ya el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics* 85: 12 (1977)). La presencia de la lesión *trp1* como una característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insecto, se usa típicamente el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificadora del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

Una vez que una molécula de anticuerpo de la descripción se ha expresado recombinantemente, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico por Proteína A y cromatografía de tamaño en columna), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Alternativamente, un método preferido para incrementar la afinidad de los anticuerpos de la descripción se describe en US 2002 0123057 A1.

#### VIII. Métodos de tratamiento usando anticuerpos Sp35 terapéuticos

Como se describe en la presente memoria, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción, pueden aliviar la inhibición mediada por NgR1 de la extensión axonal que normalmente tiene lugar en las neuronas del SNC. Esto es beneficioso en situaciones en las que se necesita la extensión neuronal o el brote de neuritas en el cerebro o médula espinal. La lesión de la médula espinal, incluyendo aplastamiento o ruptura parcial o completa, ejemplifica una situación en la que se necesita la extensión axonal, pero normalmente está inhibida a través de la operación de la ruta Nogo. Los ejemplos de enfermedades o trastornos en los que sería beneficiosa la extensión axonal y/o el brote de neuritas en el cerebro incluyen ictus, esclerosis múltiple y otras enfermedades o trastornos neurodegenerativos tales como esclerosis múltiple (MS), leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), encefalomiелitis (EPL), mielínolisis pontina central (CPM), adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), Leucodistrofia de células Globoides (enfermedad de Krabbe) y Degeneración Walleriana, neuritis óptica, mielitis transversa, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, lesión en la médula espinal, lesión cerebral traumática, lesión posterior a radiación, complicaciones neurológicas de la quimioterapia, ictus, neuropatía, neuropatía óptica isquémica aguda, deficiencia de vitamina E, síndrome de deficiencia de vitamina E aislado, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia del trigémino, parálisis de Bell, lesión de la médula espinal y todas las enfermedades neurológicas relacionadas con la muerte de células neuronales.

Los inventores han descubierto además que Sp35 se expresa en oligodendrocitos y contribuye a la biología de los oligodendrocitos. Los derivados solubles de Sp35, determinados polinucleótidos (por ejemplo, ARNi), así como determinados anticuerpos que se unen específicamente a Sp35, como se describe en la presente memoria actúan como antagonistas de la función de Sp35 en los oligodendrocitos, estimulando la proliferación, diferenciación y supervivencia de oligodendrocitos y estimulando la mielinización de neuronas *in vitro* e *in vivo*. Esto es beneficioso para enfermedades, trastornos o afecciones que implican desmielinización y dismielinización. Los ejemplos de enfermedades o trastornos en los que la proliferación, diferenciación y supervivencia de oligodendrocitos y/o la mielinización o remielinización sería beneficiosa incluyen esclerosis múltiple (MS), leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), encefalomiелitis (EPL), mielínolisis pontina central (CPM), adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), Leucodistrofia de células Globoides (enfermedad de Krabbe), Degeneración Walleriana, neuritis óptica, mielitis transversa, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, lesión en la médula espinal, lesión cerebral traumática, lesión posterior a radiación, complicaciones neurológicas de la quimioterapia, ictus, neuropatía óptica isquémica aguda, deficiencia de vitamina E, síndrome de deficiencia de vitamina E aislado, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia del trigémino y parálisis de Bell.

De acuerdo con esto, un caso de la presente descripción proporciona métodos para tratar lesión de la médula espinal, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento neuronal en el SNC, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento o diferenciación de oligodendrocitos y enfermedades que implican la desmielinización o dismielinización de neuronas del SNC en un animal que padece dicha lesión o enfermedad o que está predispuesto a contraer dicha enfermedad, comprendiendo, consistiendo esencialmente en o consistiendo el método en administrar al animal una cantidad eficaz de un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variantes o derivado de éste. Los anticuerpos de la descripción se describen en la presente memoria e incluyen los anticuerpos monoclonales listados en la Tabla 3A y 3B, anticuerpos que se unen específicamente al mismo epítipo que los anticuerpos

monoclonales listados en la Tabla 3A y 3B, anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de los anticuerpos monoclonales listados en la Tabla 3A y 3B a Sp35 y anticuerpos que comprenden polipéptidos derivados de los anticuerpos monoclonales listados en la Tabla 3A y 3B.

5 Un anticuerpo Sp35 terapéutico para usarse en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria puede prepararse y usarse como un agente terapéutico que estimula el crecimiento de neuritas en el SNC, supervivencia neuronal, orientación de axones y regeneración de axones, que estimula la supervivencia, crecimiento y/o diferenciación de oligodendrocitos, y que estimula la mielinización o remielinización de las neuronas del SNC. Las características de los anticuerpos Sp35 terapéuticos adecuados incluyen: unión a epítomos de Sp35 que resulta en el bloqueo de la actividad de Sp35, unión a Sp35 con una afinidad suficiente para incitar un efecto terapéutico y unión a Sp35 preferentemente a  
10 parejas de unión normales, por ejemplo, Receptor Nogo.

Los anticuerpos Sp35 terapéuticos pueden ser anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados, o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a Sp35. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes, bivalentes, polivalentes o bifuncionales. Los fragmentos de anticuerpo incluyen sin limitación fragmentos Fab F(ab')<sub>2</sub> y Fv.

15 Los anticuerpos Sp35 terapéuticos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos según la descripción pueden usarse en forma no marcada o no conjugada o pueden acoplarse o unirse a fármacos, marcadores o agentes de estabilización que pueden o no ejercer efectos terapéuticos adicionales.

20 Una dosificación y régimen de tratamiento específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el anticuerpo Sp35 particular, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste usado, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente y el momento de la administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando. El juicio de dichos factores por los responsables médicos está dentro de la experiencia ordinaria en la técnica. La cantidad también dependerá del paciente individual que se va a tratar, la ruta de administración, el tipo de formulación, las características del compuesto usado, la gravedad de la enfermedad y el efecto deseado. La cantidad usada puede ser determinada por principios farmacológicos y farmacocinéticos muy conocidos en la técnica.

25 En los métodos de la descripción, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos pueden administrarse directamente en el sistema nervioso central, intracerebroventricularmente o intratecalmente, por ejemplo, en una lesión crónica de MS, como se discute con más detalle más adelante.

30 En varios casos, un anticuerpo Sp35 como se ha descrito anteriormente es un antagonista de la actividad de Sp35. En determinados casos, por ejemplo, la unión de un anticuerpo antagonista de Sp35 a Sp35, según se expresa en neuronas, bloquea la inhibición del crecimiento de neuritas asociado con mielina o la muerte de células neuronales. En otros casos, la unión del anticuerpo Sp35 a Sp35, según se expresa en oligodendrocitos, bloquea la inhibición del crecimiento o diferenciación de los oligodendrocitos o bloquea la desmielinización o dismielinización de las neuronas del SNC.

35 En los métodos de la descripción, un anticuerpo Sp35, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, en particular los anticuerpos Sp35 descritos en la presente memoria, puede administrarse directamente como un polipéptido preformado, o indirectamente mediante un vector de ácido nucleico, para permitir el crecimiento axonal beneficioso, estimular la proliferación, diferenciación y supervivencia de oligodendrocitos y/o estimular la mielinización o remielinización.

40 En casos, un sujeto puede tratarse con una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo Sp35, o un fragmento de unión a antígeno, variante o análogo de éste, por ejemplo, en un vector. Las dosis para ácidos nucleicos que codifican polipéptidos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg ó 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis.

45 En algunos casos de a presente descripción, un anticuerpo Sp35, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste se administra en un método de tratamiento que incluye: (1) transformar o transfectar una célula huésped implantable con un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, que expresa un anticuerpo Sp35, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste; y (2) implantar la célula huésped transformada en un mamífero, en el sitio de una enfermedad, trastorno o lesión. Por ejemplo, la célula huésped transformada puede implantarse en el sitio de una lesión de la médula espinal o en un sitio de dismielinización. En algunos casos de la descripción, la célula huésped implantable se extrae de un mamífero, se cultiva temporalmente, se transforma o transfecta con un ácido nucleico  
50 aislado que codifica un anticuerpo Sp35 y se implanta de nuevo en el mismo mamífero del que extrajo. La célula puede extraerse, pero no se requiere, del mismo sitio en el que se implanta. Dichos casos, algunas veces conocidos como terapia génica *ex vivo*, pueden proporcionar un suministro continuo del polipéptido Sp35, localizado en el sitio del sitio de acción, durante un periodo de tiempo limitado.

Los métodos para tratar la lesión de la médula espinal, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento neuronal en el SNC, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento o diferenciación de oligodendrocitos y enfermedades que implican la desmielinización o dismielinización de neuronas del SNC que comprenden la administración de un anticuerpo Sp35, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste de la descripción se ensayan típicamente *in vitro*, y después *in vivo* en un modelo animal aceptable, para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los modelos animales adecuados, incluyendo animales transgénicos, son muy conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* para demostrar la utilidad terapéutica de un anticuerpo Sp35 descrito en la presente memoria incluyen el efecto de un anticuerpo Sp35 en una línea celular o una muestra tisular de un paciente. El efecto del anticuerpo Sp35 en la línea celular y/o muestra tisular puede determinarse utilizando técnicas conocidas para los expertos en la técnica, tales como los ensayos descritos en otro lugar de la presente memoria. Según la descripción, los ensayos *in vitro* que pueden usarse para determinar si la administración de un anticuerpo Sp35 específico está indicada, incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que una muestra tisular de un paciente se crece en cultivo y se expone a o se le administra de otra forma un compuesto y se observa el efecto de dicho compuesto en la muestra tisular.

En las composiciones de la descripción pueden incorporarse compuestos activos suplementarios. Por ejemplo, un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste de la descripción puede coformularse con y/o coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

La descripción engloba cualquier método de administración adecuado para un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste de la descripción a un tejido diana seleccionado, incluyendo inyección en bolo de una disolución acuosa o implante de un sistema con liberación controlada. El uso de un implante con liberación controlada reduce la necesidad de inyecciones repetidas.

#### IX. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Los métodos para preparar y administrar los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción a un sujeto que los necesita son muy conocidos para o se determinan fácilmente por los expertos en la técnica. La ruta de administración del anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral tal y como se usa en la presente memoria incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Mientras todas estas formas de administración se contemplan claramente como dentro del alcance de la descripción, una forma para la administración sería una disolución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o goteo. Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas de la presente memoria, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse directamente al sitio de la población celular adversa incrementando de esta manera la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Como se ha discutido previamente, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de lesión de la médula espinal en mamíferos, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento neuronal en el SNC, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento o diferenciación de oligodendrocitos y enfermedades que implican la desmielinización o dismielinización del SNC. A este respecto, se apreciará que los anticuerpos descritos se formularán de manera que se facilite la administración y se estimule la actividad del agente activo. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas según la descripción comprenden un vehículo estéril, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como disolución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y semejantes. Para los propósitos de la presente solicitud, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, conjugado o no conjugado, se espera que signifique una cantidad suficiente para conseguir la unión eficaz a una diana y para conseguir un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o para detectar una sustancia o una célula.

Las composiciones farmacéuticas comprenden vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, intercambiadores de iones, albúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilén glicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque polietilén-polioxiopropileno, polietilén glicol y grasa de lana.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propileno glicol, polietileno glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medios tamponados. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, 0,01-0,1M y preferiblemente 0,05M tampón fosfato ó 0,8% disolución salina. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer, y semejantes. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y semejantes.

Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles inyectables. En dichos casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se preservará preferiblemente frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietileno glicol líquido y semejantes) y mezclas adecuadas de éstos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Las formulaciones adecuadas para uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16ª ed. (1980).

La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y semejantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, en sí mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en la presente memoria, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones estériles inyectables, los métodos preferidos de preparación son secado en vacío y liofilización, que rinde un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración de éste. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se utilizan para rellenar contenedores tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en la forma de un kit tal como aquellos descritos en U.S.S.N. en tramitación con la presente 09/259.337 (US-2002-0102208 A1). Dichos artículos de fabricación tendrán preferiblemente etiquetas o prospectos indicando que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece, o está predispuesto a, trastornos autoinmunes o neoplásicos.

Las formulaciones parenterales pueden ser una única dosis en bolo, una infusión o una dosis de carga en bolo seguido de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse a intervalos específicos o variables fijados, por ejemplo, una vez al día o en una base "según se necesite".

Determinadas composiciones farmacéuticas pueden administrarse oralmente en una forma de dosificación aceptable incluyendo, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas. Determinadas composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones pueden prepararse como disoluciones en disolución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para aumentar la biodisponibilidad y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de un anticuerpo Sp35, o fragmento, variante o derivado de éste que puede combinarse con los materiales vehiculares para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo particular de administración. La composición puede administrarse como una única dosis, múltiples dosis o durante un periodo de tiempo establecido en una infusión. Los regímenes de dosificación también pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

En consonancia con el alcance de la presente descripción, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse a un ser humano u otro animal según los métodos

de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico. Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse a dicho ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo de la descripción con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas. Un experto en la técnica reconocerá que la forma y carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable se dictan por la cantidad de ingrediente activo con el que se va a combinar, la ruta de administración y otras variables muy conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán además que puede resultar que una mezcla que comprende una o más especies de anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción sea particularmente eficaz.

Las dosis eficaces de las composiciones de la descripción para el tratamiento de lesión en la médula espinal, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento neuronal en el SNC, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento o diferenciación de oligodendrocitos y enfermedades que implican la desmielinización o dismielinización del SNC varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medio de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano pero también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones del tratamiento pueden titularse usando métodos rutinarios conocidos para los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y eficacia.

Para el tratamiento de lesión en la médula espinal, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento neuronal en el SNC, enfermedades o trastornos asociados con la inhibición del crecimiento o diferenciación de oligodendrocitos y enfermedades que implican la desmielinización o dismielinización del SNC con anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más habitualmente 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.) del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal ó 10 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 1-10 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén en el alcance de la descripción. Dichas dosis pueden administrarse a los sujetos diariamente, en días alternativos, semanalmente o según cualquier otro esquema determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar conlleva la administración en dosificaciones múltiples durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales conllevan la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los esquemas de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg ó 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos ó 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado se encuentra en los intervalos indicados.

Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones únicas pueden ser diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indica por la medición de los niveles sanguíneos del polipéptido diana o molécula diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración plasmática de polipéptido de 1-1.000 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Alternativamente, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. La vida media de un anticuerpo Sp35 también puede prolongarse mediante la fusión a un polipéptido o resto estable, por ejemplo, albúmina o PEG. En general, los anticuerpos humanizados muestran la vida media más larga, seguidos de los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. En un caso, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse en forma no conjugada. En otro caso, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse múltiples veces en forma conjugada. En otro caso más, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse en forma no conjugada, después en forma conjugada, o viceversa.

Las composiciones de la descripción pueden administrarse por cualquier método adecuado, por ejemplo, parenteralmente, intraventricularmente, oralmente, por pulverización con inhalación, tópicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente o mediante un reservorio implantado. El término "parenteral" tal y como se usa en la presente memoria incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. Como se ha descrito previamente, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción actúan en el sistema nervioso para estimular la supervivencia, proliferación y diferenciación de oligodendrocitos y mielinización de neuronas y supervivencia neuronal, regeneración de axones y orientación de axones. De acuerdo con

esto, en los métodos de la descripción, los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos se administran de una manera tal que cruzan la barrera hemato-encefálica. Este cruce puede resultar de las propiedades físico-químicas inherentes en la molécula del anticuerpo Sp35 en sí misma, de otros componentes en una formulación farmacéutica o del uso de un dispositivo mecánico tal como una aguja, cánula o instrumentos quirúrgicos para traspasar la barrera hemato-encefálica. Cuando el anticuerpo Sp35 es una molécula que no cruza de manera inherente la barrera hemato-encefálica, por ejemplo, una fusión a un resto que facilita el cruce, las rutas adecuadas de administración son, por ejemplo, intratecal o intracraneal, por ejemplo, directamente en una lesión crónica de MS. Cuando el anticuerpo Sp35 es una molécula que cruza de manera inherente la barrera hemato-encefálica, la ruta de administración puede ser por una o más de las varias rutas descritas más adelante. En algunos métodos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™. La administración a través de la barrera hemato-encefálica puede aumentarse por una molécula vehicular, tal como un anti-receptor Fc, transferrina, anti-receptor de insulina o un conjugado con toxina o potenciador de la penetración.

Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos usados en los métodos de la descripción pueden infundirse directamente en el cerebro. Se conocen varios implantes para la infusión directa al cerebro de los compuestos y son eficaces en la administración de compuestos terapéuticos a pacientes humanos que padecen trastornos neurológicos. Éstos incluyen infusión crónica en el cerebro usando una bomba, implantado estereotácticamente, catéteres intersticiales temporales, implantes de catéter intracraneal permanente e implantes biodegradables implantados quirúrgicamente. Véase, por ejemplo, Gill *et al.*, "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease", *Nature Med.* 9: 589-95 (2003); Scharfen *et al.*, "High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas", *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 24(4): 583-91 (1992); Gaspar *et al.*, "Permanent <sup>125</sup>I Implants for Recurrent Malignant Gliomas", *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 43(5): 977-82 (1999); capítulo 66, páginas 577-580, Bellezza *et al.*, "Stereotactic Interstitial Brachytherapy", en Gildenberg *et al.*, *Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery*, McGraw-Hill (1998); y Brem *et al.*, "The Safety of Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Followed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Malignant Gliomas: Phase I Trial", *J. Neuro-Oncology* 26: 111-23 (1995).

Las composiciones también pueden comprender un anticuerpo Sp35 dispersado en un material vehicular biocompatible que funciona como un sistema de administración o soporte adecuado para los compuestos. Los ejemplos adecuados de vehículos de liberación sostenida incluyen matrices de polímero semipermeables en la forma de artículos con forma tales como supositorios o cápsulas. Las matrices de liberación sostenida implantables o microcapsulares incluyen poliláctidos (Patente U.S. No. 3.773.319; EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22: 547-56 (1985)); poli(2-hidroxietil-metacrilato), etilen vinil acetato (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105 (1982)) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-buti-rico (EP 133.988).

En algunos casos de la descripción, un anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste de la descripción se administra a un paciente por infusión directa en una región apropiada del cerebro. Véase, por ejemplo, Gill *et al.*, *supra*. Están disponibles y pueden aplicarse técnicas alternativas para administrar un anticuerpo Sp35 según la descripción. Por ejemplo, el posicionamiento estereotáctico de un catéter o implante puede conseguirse usando la unidad Riechert-Munding y la unidad de localización multipropósito ZD (Zamorano-Dujovny). Un escaneo con tomografía computerizada (CT) con contraste aumentado, inyectando 120 ml de omnipaque, 350 mg yodo/ml, con un espesor de corte de 2 mm puede permitir la planificación de tratamiento multiplanar tridimensional (STP, Fischer, Freiburg, Alemania). Este equipamiento permite la planificación tomando como base estudios de formación de imágenes por resonancia magnética, aunando la información diana de CT y MRI para la confirmación clara de la diana.

El sistema estereotáctico Leksell (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA) modificado para uso con un escáner GE CT (General Electric Company, Milwaukee, WI) así como el sistema estereotáctico Brown-Roberts-Wells (BRW) (Radioionics, Burlington, MA) puede usarse para este propósito. Así, en la mañana del implante, el anillo anular de la base del marco estereotáctico BRW puede unirse al cráneo del paciente. Pueden obtenerse secciones seriadas de CT a intervalos de 3 mm a través de la región (tejido diana) con un marco localizador de varilla de grafito fijado a la placa base. Puede ejecutarse un programa de planificación de tratamiento computerizado en un ordenador VAX 11/780 (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.) usando coordenadas de CT de las imágenes de varilla de grafito para mapear entre el espacio CT y el espacio BRW.

Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o afección que necesita tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico).

#### X. Diagnóstico

La descripción proporciona además un método de diagnóstico útil durante el diagnóstico de trastornos o lesiones neuronales, que implica medir el nivel de expresión de la proteína o transcrito Sp35 en tejido u otras células o fluido



corporal de un individuo y comparar el nivel de expresión medido con unos niveles de expresión estándar de Sp35 en tejido o fluido corporal normal, mediante lo cual un incremento en el nivel de expresión comparado con el estándar es indicativo de un trastorno.

5 Los anticuerpos específicos de Sp35 pueden usarse para ensayar niveles de proteína en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos para los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Jalkanen *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101: 976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, *J. Cell. Biol.* 105: 3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión de proteínas incluyen inmunoensayos, tal como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), inmunoprecipitación o transferencia western. Los ensayos adecuados se describen con más detalle en otro lugar de la presente memoria.

10 Por "ensayar el nivel de expresión del polipéptido Sp35" se pretende medir o estimar cualitativamente o cuantitativamente el nivel del polipéptido Sp35 en una primera muestra biológica bien directamente (por ejemplo, determinando o estimando el nivel absoluto de proteínas) o relativamente (por ejemplo, comparando con el nivel del polipéptido asociado a cáncer en una segunda muestra biológica). Preferiblemente, el nivel de expresión del polipéptido Sp35 en la primera muestra biológica se mide o estima y se compara con un nivel de polipéptido Sp35 estándar, tomándose el estándar de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o habiéndose determinado promediando niveles de una población de individuos que no tienen el trastorno. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce el nivel de polipéptido Sp35 "estándar", puede usarse repetidamente como un estándar para comparación.

20 Por "muestra biológica" se pretende cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular, cultivo tisular u otra fuente de células que potencialmente expresan Sp35. Los métodos para obtener biopsias tisulares y fluidos corporales de mamíferos son muy conocidos en la técnica.

Los anticuerpos Sp35 para uso en los métodos de diagnóstico descritos anteriormente incluyen cualquier anticuerpo Sp35 que se une específicamente a un producto génico Sp35, como se describe en otro lugar de la presente memoria.

#### XI. Inmunoensayos

25 Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden ensayarse para unión inmuno-específica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen pero no están limitados a sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos en "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones de difusión de precipitina en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por nombrar sólo algunos. Dichos ensayos son rutinarios y muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, Vol. 1 (1994). Los inmunoensayos ejemplares se describen brevemente más adelante (pero no se pretenden como limitación).

35 Los protocolos de inmunoprecipitación comprenden generalmente lisar una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (1% NP-40 o Tritón X-100, 1% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 0,15 M NaCl, 0,01 M fosfato de sodio a pH 7,2, 1% Trasilol) suplementado con proteína fosfatasa y/o inhibidores de proteasa (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 4 grados C., añadir lechos de sefariosa de proteína A y/o proteína G al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 4 grados C., lavar los lechos en tampón de lisis y resuspender los lechos en SDS/tampón de muestra. La capacidad del anticuerpo de interés de inmunoprecipitar un antígeno particular puede evaluarse, por ejemplo, por análisis de transferencia western. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que pueden modificarse para incrementar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el fondo (por ejemplo, pre-aclaramiento del lisado celular con lechos de sefariosa). Para una discusión adicional respecto a los protocolos de inmunoprecipitación véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, Vol. 1 (1994) en 10.16.1.

50 El análisis por transferencia western comprende generalmente preparar muestras de proteínas, electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poli(acrilamida) (por ejemplo, 8%-20% SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteínas del gel de poli(acrilamida) a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nilon, bloquear la membrana en disolución de bloqueo (por ejemplo, PBS con 3% BSA o leche desnatada), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) o molécula radiactiva (por ejemplo, 32p ó 125I) diluida en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado y detectar la presencia del antígeno.

55

Un experto en la técnica conocerá los parámetros que pueden modificarse para incrementar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para una discusión adicional respecto a los protocolos de transferencia western véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, Vol. 1 (1994) en 10.8.1.

5 Los ELISA comprenden preparar el antígeno, recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo y detectar la presencia del antígeno. En los ELISA, el anticuerpo de interés no tiene que estar conjugado a un compuesto detectable; en lugar de esto, puede añadirse al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno el anticuerpo puede utilizarse para recubrir el pocillo. En este caso, puede añadirse un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable después de la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que pueden modificarse para incrementar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISA conocidas en la técnica. Para una discusión adicional respecto a los ELISA véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, Vol. 1 (1994) en 11.2.1.

10 La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse por ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo,  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$ ) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés para un antígeno particular y las velocidades de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos por análisis de representaciones scatchard. La competición con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno se incuba con el anticuerpo de interés que se conjuga con un compuesto marcado (por ejemplo,  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$ ) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.

25 Los anticuerpos Sp35, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de éstos de la descripción pueden emplearse, además, histológicamente, como en inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica o ensayos no inmunológicos, para la detección *in situ* de productos génicos antigénicos de cáncer o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de éstos. La detección *in situ* puede conseguirse extrayendo una muestra histológica de un paciente y aplicando a ésta un anticuerpo Sp35 marcado, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste, preferiblemente aplicado por superposición del anticuerpo marcado (o fragmento) en una muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia de la proteína Sp35, o variantes conservadas o fragmentos peptídicos, sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la descripción, los expertos en la técnica percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tal como procedimientos de tinción) puede modificarse con el fin de conseguir dicha detección *in situ*.

35 Los inmunoensayos y no inmunoensayos para los productos génicos Sp35 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de éstos comprenderán típicamente incubar una muestra, tal como un fluido biológico, un extracto tisular, células recogidas recientemente o lisados de células que se han incubado en cultivo celular, en presencia de un anticuerpo marcado de manera detectable capaz de unirse a Sp35 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de éste y detectar el anticuerpo unido por cualquiera de varias técnicas muy conocidas en la técnica.

40 La muestra biológica puede ponerse en contacto con e inmovilizarse en un soporte o vehículo de fase sólida tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido que es capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte puede lavarse entonces con tampones adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo Sp35 marcado de manera detectable, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste. El soporte de fase sólida puede lavarse entonces con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. Opcionalmente, el anticuerpo se marca posteriormente. La cantidad de marca unida en el soporte sólido puede detectarse por medios convencionales.

45 Por "soporte o vehículo en fase sólida" se pretende cualquier soporte capaz de unir un antígeno o un anticuerpo. Los soportes o vehículos muy conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabbros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser bien soluble en algún grado o insoluble para los propósitos de la presente descripción. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Así, la configuración del soporte puede ser esférica, como un en un lecho, o cilíndrica, como en la superficie interna de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira de ensayo, etc. Los soportes preferidos incluyen lechos de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpo o antígeno, o serán capaces de establecer los mismos por uso de experimentación rutinaria.

La actividad de unión de un lote dado de anticuerpo Sp35, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de éste puede determinarse según métodos muy conocidos. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

5 Existe una variedad de métodos disponibles para medir la afinidad de una interacción anticuerpo-antígeno, pero relativamente pocos para determinar las constantes de velocidad. La mayor parte de los métodos se basa en el marcaje del anticuerpo o antígeno, lo que complica inevitablemente las mediciones rutinarias e introduce incertidumbres en las cantidades medidas.

10 La resonancia de plasmón superficial (SPR) según se realiza en BIAcore ofrece varias ventajas sobre los métodos convencionales de medición de la afinidad de interacciones anticuerpo-antígeno: (i) no requiere marcar el anticuerpo o antígeno; (ii) los anticuerpos no necesitan ser purificados previamente, puede usarse directamente el sobrenadante del cultivo celular; (iii) se posibilitan las mediciones en tiempo real, lo que permite la comparación semi-cuantitativa rápida de diferentes interacciones de anticuerpos monoclonales y son suficientes para muchos propósitos de evaluación; (iv) puede regenerarse una superficie bioespecífica de manera que una serie de diferentes anticuerpos monoclonales pueden compararse fácilmente en condiciones idénticas; (v) los procedimientos analíticos están totalmente automatizados y pueden realizarse series de mediciones extensas sin intervención del usuario. BIAApplications Handbook, versión AB (reimpreso 1998), BIACORE código No. BR-1001-86; BIATECHNOLOGY Handbook, versión AB (reimpreso 1998), BIACORE código No. BR-1001-84.

20 Los estudios de unión basados en SPR requieren que un miembro de una pareja de unión esté inmovilizado en una superficie sensora. La pareja de unión inmovilizada se refiere como el ligando. La pareja de unión en disolución se refiere como el analito. En algunos casos, el ligando se une indirectamente a la superficie a través de la unión de otra molécula inmovilizada, que se refiere como la molécula de captura. La respuesta de SPR refleja un cambio en la concentración de masa en la superficie detectora al unirse o disociarse los analitos.

25 Tomando como base el SPR, las mediciones de BIAcore en tiempo real monitorizan directamente las interacciones cuando se producen. La técnica es muy apropiada para la determinación de parámetros cinéticos. La clasificación de la afinidad comparativa es extremadamente sencilla de realizar y tanto las constantes cinéticas como de afinidad pueden derivarse de los datos del sensograma.

30 Cuando se inyecta analito en un puo discreto a través de una superficie de ligando, el sensograma resultante puede dividirse en tres fases esenciales: (i) Asociación del analito con ligando durante la inyección de la muestra; (ii) Equilibrio o estado estacionario durante la inyección de la muestra, en el que la velocidad de unión del analito está equilibrada por disociación del complejo; (iii) Disociación del analito de la superficie durante el flujo de tampón.

Las fases de asociación y disociación proporcionan información sobre las cinéticas de la interacción analito-ligando ( $k_a$  y  $k_d$ , las velocidades de la formación y disociación del complejo,  $K_d/k_a = K_D$ ). La fase de equilibrio proporciona información sobre la afinidad de la interacción analito-ligando ( $K_D$ ).

35 El software BIAevaluation proporciona facilidades exhaustivas para el ajuste de curvas usando tanto integración numérica como algoritmos de ajuste global. Con el análisis adecuado de los datos, pueden obtenerse constantes separadas de velocidad y afinidad para la interacción a partir de investigaciones sencillas BIAcore. El intervalo de afinidades mensurable mediante esta técnica es muy amplio variando de mM a pM.

40 La especificidad de epítipo es una característica importante de un anticuerpo monoclonal. El mapeo de epítipos con BIAcore, a diferencia de las técnicas convencionales que usan radioinmunoensayo, ELISA u otros métodos de adsorción a superficie, no requiere el marcaje de o anticuerpos purificados y permite ensayos de especificidad multi-sitio usando una secuencia de varios anticuerpos monoclonales. Además, pueden procesarse automáticamente grandes números de análisis.

45 Los experimentos de unión por parejas ensayan la capacidad de dos MAb de unirse simultáneamente al mismo antígeno. Los MAb dirigidos frente a epítipos separados se unirán independientemente, mientras que los MAb dirigidos frente a epítipos idénticos o muy relacionados interferirán con la unión del otro. Estos experimentos de unión con BIAcore son sencillos de realizar.

50 Por ejemplo, se puede usar una molécula de captura para unir el primer Mab, seguido de la adición de antígeno y segundo MAb secuencialmente. Los sensogramas revelarán: 1. cuánto del antígeno se une al primer MAb, 2. en qué grado el segundo MAb se une al antígeno unido a la superficie, 3. si el segundo MAb no se une, si revertir el orden del ensayo por parejas altera los resultados.

La inhibición peptídica es otra técnica usada para el mapeo de epítipos. Este método puede complementar los estudios de unión de anticuerpo por parejas y puede relacionar epítipos funcionales con características estructurales cuando se

conoce la secuencia primaria del antígeno. Los péptidos o fragmentos de antígeno se ensayan para inhibición de la unión de diferentes MAb a antígeno inmovilizado. Se asume que los péptidos que interfieren con la unión de un MAb dado están relacionados estructuralmente con el epítipo definido por ese MAb.

5 La práctica de la descripción empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Sambrook *et al.*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, ed., Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1992), *DNA Cloning*, D.N. Glover ed., Volúmenes I y II (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, M.J. Gait ed., (1984); Mullis *et al.*, Pat. U.S. No. 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization*, B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1984); *Transcription And Translation*, B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1984); *Culture Of Animal Cells*, R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado, *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc., N.Y.; *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, J.H. Miller y M.P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155 (Wu *et al.* eds.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres (1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV, D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., (1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

20 Los principios generales de preparación de anticuerpos por ingeniería se muestran en *Antibody Engineering*, 2ª edición, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995). Los principios generales de preparación de proteínas por ingeniería se muestran en *Protein Engineering, A Practical Approach*, Rickwood, D., *et al.*, Eds., IRL Press en Oxford Univ. Press, Oxford, Ing. (1995). Los principios generales de anticuerpos y unión anticuerpo-hapteno se muestran en: Nisonoff, A., *Molecular Immunology*, 2ª ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); y Steward, M.W., *Antibodies, Their Structure and Function*, Chapman y Hall, Nueva York, NY (1984). Además, se siguen generalmente los métodos estándar en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.* (eds), *Basic and Clinical-Immunology* (8ª ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) y Mishell y Shiigi (eds), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W.H. Freeman and Co., Nueva York (1980).

30 Los trabajos de referencia estándar que muestran principios generales de inmunología incluyen *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein, J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, Nueva York (1982); Kennett, R., *et al.*, eds., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Nueva York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" en Burden, R., *et al.*, eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984), Kuby *Immunology* 4ª ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J Kindt y Barbara A. Osborne, H. Freeman & Co. (2000); Roitt, L., Brostoff, J. y Male D., *Immunology* 6ª ed. Londres: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. y Lichtman, A., *Cellular and Molecular Immunology* Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); Kontermann y Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Verlag (2001); Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press (2001); Lewin, *Genes VIII*, Prentice Hall (2003); Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); Dieffenbach y Dveksler, *PCR Primer* Cold Spring Harbor Press (2003).

## Ejemplos

### 40 Ejemplo 1

Sp35 está implicado en la biología de los oligodendrocitos

45 Los oligodendrocitos maduran a través de varios estadios de desarrollo desde células progenitoras A2B5 (que expresan A2B5), que se diferencian en oligodendrocitos pre-mielinizantes (que expresan O1 y O4) y finalmente en oligodendrocitos mielinizantes maduros (que expresan O1, O4 y MBP). Así, mediante la monitorización de la presencia y ausencia de los marcadores A2B5, O1, O4 y MBP es posible determinar el estadio de desarrollo de una célula dada y evaluar el papel de Sp35-Fc en la biología de los oligodendrocitos. Para una revisión general de la biología de los oligodendrocitos, véase, por ejemplo, Baumann y Pham-Dinh, *Physiol. Rev.* 81: 871-927 (2001).

50 Los anticuerpos monoclonales frente a O4, MBP y CNPasa fueron de Sternberger Monoclonals; el anticuerpo frente a APC (clon CC-1; ref. 29) fue de Calbiochem. Otros anticuerpos fueron frente a  $\beta$ III tubulina (Covance), Sp35 (Biogen Idec), Fyn (Santa Cruz Biotechnology) y fosfo-Fyn (Biosource). Los anticuerpos monoclonales frente a A2B5 están disponibles en Chemicon.

Sp35 se expresa en oligodendrocitos

La expresión de Sp35 en cultivos de neuronas de rata purificadas P13 CG, oligodendrocito P2 y astrocitos P4 se analizó por la reacción en cadena de la polimerasa después de transcripción inversa (RT-PCR). Se usó un kit de Ambion, Inc. para extraer ARNm de células de cerebro de rata según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo RT-PCR semicuantitativa usando el cebador directo 5' AGAGACATGCGATTGGTGA 3' (SEQ ID NO: 344) y el cebador inverso 5' AGAGATGTAGACGAGGTCATT 3' (SEQ ID NO: 345) mostró expresión alta en neuronas, expresión más baja en oligodendrocitos y ausencia de expresión en astrocitos.

La expresión de Sp35 en oligodendrocitos se confirmó por hibridación *in situ* en secciones derivadas de nervio óptico de ratas adultas. Las secciones de nervio óptico de rata se prepararon y procesaron como se describe en Mi *et al.*, "Sp35 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signalling complex", *Nat. Neurosci.* 7: 221-28 (2004) y se probó con ARN de Sp35 antisentido o con sentido marcados con digoxigenina usando los primeros 500 nucleótidos de la secuencia codificadora de Sp35. Las secciones se tiñeron según las instrucciones del fabricante usando un kit de Amplificación de la Señal Tiramida (Amersham Biosciences) y un kit de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado fluorescente (Perkin Elmer). Para los análisis combinados *in situ* y de inmunofluorescencia, las secciones se probaron en primer lugar con ARN marcados con digoxigenina y después con anticuerpos, por ejemplo, anticuerpo CC1 (Calbiochem; un marcador de oligodendrocitos maduros) o anticuerpo anti-Sp35. Observamos que los oligodendrocitos que hibridaban con un sonda Sp35 antisentido también se coteñían con un anticuerpo frente a CC1 (datos no mostrados). No se observó un marcaje específico usando una sonda Sp35 con sentido. La expresión de Sp35 en oligodendrocitos también se confirmó por estudios de inmunohistoquímica de secciones de tejido de la región de ventrículo lateral de corteza de rata P7. Una mayoría de células corticales que se marcaron con anticuerpo CC1 también se marcaron con anticuerpo anti-Sp35. Datos no mostrados. La especificidad de la interacción se confirmó por preadsorción del anticuerpo anti-Sp35 con Sp35-Fc (véase el Ejemplo 2), lo que eliminó la señal.

La inactivación con ARNi específico de Sp35 de la expresión de Sp35 estimula el crecimiento y diferenciación de los oligodendrocitos.

Se usó ARNi específico de Sp35 para suprimir la expresión de Sp35 en células precursoras de oligodendrocitos para examinar cómo contribuye Sp35 al crecimiento y diferenciación de los oligodendrocitos. Se infectaron 50.000 células precursoras de oligodendrocitos A2B5 con lentivirus que portaba secuencia de ARNi específico de Sp35 o ARNi control preparados como sigue.

Se compararon secuencias de ADN de Sp35 murinas y de rata para encontrar regiones homólogas para uso para ARN en horquilla pequeños (ARNsh) candidatos. Se construyó CH324, para la expresión en lentivirus de ARNi de Sp35, hibridando los oligonucleótidos LV1-035 y LV1-036 y ligando a pLL3.7 digerido con *HpaI* y *XhoI*. El vector pLL3.7, la metodología adicional y la producción de virus fueron como se describe en Rubinson *et al.*, *Nat. Genet.* 33, 401-06 (2003). Los oligonucleótidos de ARNi de Sp35 se adquirieron en MWG y tienen las secuencias siguientes: LV1-035 (oligo con sentido) 5' - TGA TCG TCA TCC TGC TAG ACT TCA AGA GAG TCT AGC AGG ATG ACG ATC TTT TTT C - 3' (SEQ ID NO: 346) y LV1-036 (oligo antisentido) 5' - TCG AGA AAA AAG ATC GTC ATC CTG CTA GAC TCT CTT GAA GTC TAG CAG GAT GAC GAT CA - 3' (SEQ ID NO: 347).

El ARNi control se diseñó con las mismas secuencias oligonucleotídicas excepto para los cambios de nucleótidos indicados en letras minúsculas: 5' - TGA TCc TCA TcC tCt Tat ACT TCA AGA GAG TgT AGC AGG ATG AcG ATC TTT TTT CTC GA - 3' (SEQ ID NO: 348) y 5' - TCG AGA AAA AAG ATC GTC ATC CTG CTA GAC TCT CTT GAA GTa TAG aAG GAT GAC GAT CA - 3' (SEQ ID NO: 349).

Antes de producir los lentivirus, el ADN de pLL3.7 o ARNsh candidato en pLL3.7 se cotransfectaron con plásmido murino Sp35 etiquetado con HA a una proporción de 5 a 1 en células CHO en un formato de 6 pocillos. La inactivación se analizó por la detección por transferencia western de Sp35-etiqueta HA de lisados de células CHO transfectadas así como por transferencia northern de ARN total preparado a partir de pocillos duplicados. La transferencia se probó con un fragmento de ADNc de Sp35. Los ensayos se realizaron 48 horas después de la transfección. Como se esperaba, hubo una reducción de 10 veces en el ARNm Sp35 en las células CHO tratadas con ARNi CH324 respecto a las células tratadas control. Datos no mostrados. Se generaron lentivirus con ARNi que portaban proteína verde fluorescente (GFP) como se describe en Rubinson *et al.* En los cultivos tratados con ARNi control o ARNi Sp35, aproximadamente el 80% de los oligodendrocitos fueron positivos para GFP. El número total de células no se alteró por los tratamientos con ARNi. Para cuantificar los efectos de ARNi en la diferenciación, sólo se consideraron los oligodendrocitos que expresaban GFP.

Se crecieron poblaciones enriquecidas de oligodendrocitos de ratas hembra Long Evans P2 como se describe por Conn, *Meth. Neurosci.* 2: 1-4 (Academic Press; 1990) con modificaciones como sigue. Brevemente, el prosencefalo se diseccionó y se puso en disolución de sal tamponada de Hank (HBSS; Invitrogen). El tejido se cortó en fragmentos de 1 mm y se incubó a 37°C durante 15 min en 0,01% tripsina y 10 µg/ml ADNasa. Las células disociadas se plaquearon en frascos de cultivo tisular T75 recubiertos con poli-L-lisina y se crecieron a 37°C durante 10 d en medio DMEM con 20%

suero fetal de ternera (Invitrogen). Los precursores de oligodendrocitos (A2B5<sup>+</sup>) se recogieron agitando el frasco toda la noche a 200 rpm a 37°C, lo que resulta en una población 95% pura. Los cultivos se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con alta glucosa (DMEM) con FGF/PDGF (10 ng/ml; Peprotech) durante 1 semana. La eliminación de FGF/PDGF permitió que las células A2B5<sup>+</sup> se diferenciaron en oligodendrocitos premielinizantes O4<sup>+</sup> después de 3-7 d y que se diferenciaron en oligodendrocitos O4<sup>+</sup> y MBP<sup>+</sup> maduros después de 7-10 d. Estos estados de diferenciación son evidentes fácilmente a partir de cambios en la morfología: las células A2B5<sup>+</sup> tienen forma bipolar, los oligodendrocitos premielinizantes O4<sup>+</sup> tienen procesos más largos y más ramificados y los oligodendrocitos maduros MBP<sup>+</sup> contienen estructuras de láminas de mielina entre los procesos.

Las células precursoras de oligodendrocitos A2B5 se infectaron con el lentivirus que contiene el ARNi CH324. Las células resultantes se cultivaron durante 3 días y se contó el número de oligodendrocitos positivos para O4 (un marcador para la diferenciación de los oligodendrocitos). La expresión endógena de Sp35 se redujo por infección con lentivirus ARNi Sp35 y se confirmó por RT-PCR. La reducción de Sp35 resultó en oligodendrocitos más altamente diferenciados, maduros comparado con las células control infectadas, como fue evidente por incrementos en la longitud de los procesos celulares y por la presencia de estructuras de lámina de mielina abundantes (datos no mostrados). En las células que expresaban ARNi Sp35, hubo tres veces más oligodendrocitos maduros (positivos para O4) que en los cultivos control. Estos datos indican que Sp35 puede regular negativamente la diferenciación de los oligodendrocitos.

Sp35 dominante negativo estimula el crecimiento y diferenciación de los oligodendrocitos

Se construyeron vectores lentivirales que expresan Sp35 de tipo salvaje y una forma dominante-negativa de Sp35. Las secuencias de ADN que codifican Sp35 de longitud completa de ratón (FL-Sp35, residuos de aminoácidos 34-614 de SEQ ID NO: 2) se amplificó por PCR usando los cebadores 5' - GAG GAT CTC GAC GCG GCC GCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TG - 3' (SEQ ID NO: 350) y 5' - GGG GCG GAA TTG GAT CCT CAC AGA TCC TCT TCT GAG ATG AG - 3' (SEQ ID NO: 351) y se insertó en el vector lentiviral HRST-IRESeGFP en los sitios *NotI* y *BamHI*. De manera similar, la secuencia de ADN que codifica Sp35 dominante negativo (DN-Sp35, residuos de aminoácidos 34-581 de SEQ ID NO: 2) se amplificó por PCT usando los cebadores 5' - GAG GAT CTC GAC GCG GCC GCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TG - 3' (SEQ ID NO: 352) y 5' - GAT ACG GAT CCT CAG CCT TTG CCC CGG CTC CAT AGA AAC AGC - 3' (SEQ ID NO: 353). Los plásmidos FL-Sp35 y DN-Sp35 se transfectaron en células 293 para producir lentivirus como se describe por Rubinson *et al.*, "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference", *Nat. Genet.* 33: 401-06 (2003). Los oligodendrocitos se infectaron con lentivirus a 2 MOI por célula y se confirmó la expresión de FL-Sp35 y DN-Sp35 por transferencia western.

DN-Sp35 estimuló la diferenciación de los oligodendrocitos, lo que produjo un incremento en el número de oligodendrocitos maduros. Por el contrario, la sobreexpresión de Sp35 de longitud completa (FL-Sp35) tuvo el efecto opuesto e inhibió la diferenciación, como fue evidente por una reducción en el número de oligodendrocitos maduros comparado con el control (datos no mostrados).

Ejemplo 2

Construcción y purificación de la proteína de fusión Sp35-Fc

Se hizo una construcción fusionando la parte extracelular de Sp35 humano (residuos 1-532) a la región bisagra y Fc de IgG1 humana para estudiar la función biológica de Sp35. Se obtuvo una secuencia codificadora parcial de Sp35 humano por PCR a partir del clon 227.2 usando el cebador directo 5' - CAG CAG GTC GAC GCG GCC GCA TGC TGG CGG GGG GCG T - 3' (SEQ ID NO: 354) y el cebador inverso 5' - CAG CAG GTC GAC CTC GCC CGG CTG GTT GGC CAA CCA GCC GGG CGA GGT CGA CCT CGA GG - 3' (SEQ ID NO: 355).

El producto de PCR con extremos romos se subclonó en el sitio *SrfI* del vector de PCR SCRIPT AMP (Stratagene) para crear PCR SCRIPT AMP-Sp35. Se aisló un fragmento *Sall* de PCR SCRIPT AMP-Sp35 y se subclonó en el vector PCRCAMP Ig (derivado del vector de Stratagene PCR SCRIPT AMP). En el vector PCRCAMP Ig, la secuencia bisagra y Fc gamma se subclona como un fragmento *Sall*(5') a *NotI*(3'). El fragmento *Sall* Sp35 se subclonó en el sitio *Sall* del vector PCRCAMP Ig fusionando de esta manera la secuencia señal de Sp35 y el dominio extracelular (codones 1-532) en marco con las secuencias que codifican la región bisagra y Fc de Ig1 humana. Los aislados correctos se identificaron y un fragmento *NotI* que engloba el fragmento Sp35 Fc se subclonó en el único sitio de clonación *NotI* del vector de expresión CHO, PV90 (Biogen Idec). El plásmido resultante se confirmó por secuenciación de ADN y se designó GT123.

Se generaron líneas celulares estables que expresan la proteína de fusión Sp35-Fc por electroporación de células huésped CHO DG44 con el plásmido GT123. Las células CHO transfectadas se cultivaron en MEM alpha minus en presencia de 10% suero dializado y 4 mM glutamina para seleccionar el crecimiento independiente de nucleósido. Catorce días después de la transfección, las células se alimentaron con medio fresco. Para cribar para células que expresan Sp35-Fc, las células CHO se marcaron con anti-IgG humana de cabra marcada con ficoeritrina (PE) (Jackson Labs) y se sometieron a separación por citometría con flujo de alta velocidad en un FACS Mo-Flo (Cytomation). Se

seleccionaron las células que expresaban los niveles más altos de Sp35-Fc. Estas células se expandieron en cultivo durante 7 días, se volvieron a marcar y se volvieron a separar. Las células que expresaban los niveles más altos de Sp35-Fc se aislaron como clones individuales en placas de 96 pocillos. Estos clones se crecieron durante dos semanas y se alimentaron con medio fresco un día antes del análisis FACS para comprobar los niveles de expresión. Los clones que expresaban los niveles más altos de Sp35-Fc se expandieron y se establecieron bancos celulares congelados. Las líneas celulares se adaptaron para crecer en cultivo en suspensión en el medio sin suero BCM16. La titulación de Sp35-Fc producido por estos clones se determinó creciendo líneas celulares a 37°C durante 4-5 propagaciones, creciendo las células hasta 50% la densidad celular máxima y cultivándolas durante 10-15 días a 28°C hasta que la densidad de las células viables cayó hasta 75%. En este momento, el medio de cultivo se recogió, se aclaró de células y restos celulares por centrifugación y los sobrenadantes de los cultivos se titularon para niveles de Sp35-Fc por análisis por transferencia Western usando un anticuerpo anti-Ig humana (Jackson Lab) como sonda.

La proteína de fusión Sp35-Fc se purificó del medio de cultivo aclarado como sigue: se añadieron 9 ml de 1M HEPES pH 7,5 a 900 ml de medio condicionado. El medio se cargó por lotes durante 3 hr a 4°C en 3 ml de Proteína A Sefarosa (Amersham Bioscience). La resina se recogió en una columna de 1,5 cm (D.I.) y se lavó cuatro veces con 3 ml de PBS, dos veces con 4 ml de PBS que contenía 800 mM NaCl, y de nuevo con 3 ml de PBS. La Sp35-Fc se eluyó de la columna con 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,8 y 100 mM NaCl en fracciones de 1,5 ml y se neutralizó añadiendo 75 µl de 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,6. Las fracciones que contenían los picos de proteína se identificaron por absorbancia a 280 nm, se combinaron y se sometieron a purificación adicional en una columna de Proteína A de 1 ml. Antes de la carga, se añadió NaCl a 600 mM y HEPES, pH 7,5 a 50 mM. La columna se lavó dos veces con 600 µl de 10 mM HEPES pH 7,5 y 1 M NaCl y con 1 ml PBS. Sp35-Fc se eluyó de la columna con 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,8 y 100 mM NaCl, recogiendo fracciones de 0,5 ml y neutralizando por la adición de 25 µl de 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,6. Las fracciones que contenían los picos de proteína se identificaron por absorbancia a 280 nm y se combinaron. Mediante SDS-PAGE reductora, la proteína Sp35-Fc migró como una banda única (>95% pura) con una masa aparente de 90 kDa. En condiciones no reductoras, la proteína corrió como un dímero con una masa aproximada de 180 kDa. La proteína Sp35-Fc purificada se alicuotó y almacenó a -70°C.

### Ejemplo 3

#### Producción de anticuerpos monoclonales específicos de Sp35

Los anticuerpos anti-Sp35 que se unen específicamente a un polipéptido Sp35 de la descripción se prepararon usando los métodos y procedimientos siguientes.

#### 30 A. Ensayos de cribado de anticuerpos

##### 1. Ensayo ELISA

Se añadió Sp35-Fc (0,5 µg en 50 µl de 0,1 M tampón bicarbonato de sodio, pH 9,0) a cada pocillo de placas de 96 pocillos MaxiSorp™ (Nunc™). Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora ó 4°C durante 16 horas. Los sitios de unión no específica en las placas se bloquearon usando 25 mM HEPES, pH 7,4 que contenía 0,1% BSA, 0,1% ovoalbúmina, 0,1% (5% p/v) leche desnatada seca en 150 mM NACE) y 0,001% azida. Se hicieron diluciones de suero o sobrenadantes de hibridoma (por ejemplo, diluciones seriadas de tres veces) a lo largo de cada fila de la placa y se incubó a 25°C durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBS, se añadieron 50 µl de una dilución 1:10.000 de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch Inc.) a cada pocillo y se incubó adicionalmente durante 1 hora. Después de tres lavados, se desarrolló color mediante TMB (Pierce) y se paró con 2 M ácido sulfúrico. La intensidad del color se monitorizó en un espectrofotómetro a 450 nm.

##### 2. Ensayo FACS

Se marcaron células COS-7 con 0,1 µM CellTracker™ Green CMFDA (Molecular Probes, Eugene, OR) como describe el proveedor. Se mezclaron volúmenes iguales de células control marcadas con CellTracker™ con células Sp35-COS-7 lavadas (producidas por la transfección temporal de vector de expresión Sp35) antes de incubar con suero de ensayo o sobrenadantes de hibridoma anti-Sp35. Cincuenta microlitros de la mezcla celular se dispensaron en cada pocillo de una placa de poliestireno de 96 pocillos con fondo en V (Costar® 3877, Corning, NY) y se añadieron 100 µl de suero de ratón, sobrenadante de hibridoma o un anticuerpo anti-Sp35 control. Después de incubar a 4°C durante 30 minutos, las células se lavaron y se incubaron con 50 µl de anticuerpo secundario específico anti-Fc gamma de IgG de ratón de cabra fragmento (F(ab')<sub>2</sub> purificado por afinidad conjugado con ficoeritrina (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA) en PBS. Al final de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se suspendieron en 200 µl de PBS que contenía 1% suero fetal bovino (FBS) y se sometieron a análisis FACS. Alternativamente, se mezclaron células Sp35-COS-7 con suero de ratón o sobrenadante de hibridoma y se trataron con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con R-ficoeritrina y se sometieron directamente a análisis FACS estándar.

## B. Producción a partir de hibridomas de anticuerpos monoclonales murinos anti-Sp35

Se inmunizaron ratones hembra RBF de ocho semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) intraperitonealmente con una emulsión que contenía 50 µg Sp35-Fc (aminoácidos 34 a 532 de SEQ ID NO: 2 fusionados a la región bisagra y Fc de IgG1 humana), producido como se ha descrito en el Ejemplo 2 o se inmunizaron intraperitonealmente con una emulsión que contenía 50 µg de Sp35-Fc humano y 50 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO) una vez cada dos semanas. Los sueros de los ratones inmunizados se recogieron antes de la primera inmunización y 1 semana después de la segunda y tercera inmunizaciones y las titulaciones del anticuerpo anti-Sp35 se midieron por ensayo FACS en células COS-7 que expresaban Sp35 como se ha descrito anteriormente. Se proporcionó una dosis final de refuerzo después de la tercera inmunización y tres días antes de cuando se iniciaron las fusiones de hibridomas.

Los sueros de ratones inmunizados con los diferentes péptidos Sp35 se cribaron por ELISA como se ha descrito anteriormente. Los ratones que fueron positivos para los anticuerpos que se unieron específicamente a células COS-7 que expresaban Sp35 se identificaron por citometría de flujo (FACS) como se ha descrito anteriormente y se sacrificaron. Se aislaron los esplenocitos de los ratones y se fusionaron con el mieloma FL653 (un derivado APRT de un mieloma de ratón Balb/c Ig-/HGPRT, mantenido en DMEM que contenía 10% FBS, 4.500 mg/mL glucosa, 4 mM L-glutamina y 20 mg/ml 8-azaguanina) como se describe en Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, ed. Kennett, R.H., McKearn, T.J. y Bechtol, K.B. Nueva York: Plenum Press (1982). Las células fusionadas se plaquearon en placas de 24 ó 48 pocillos (Corning Glass Works, Corning, NY) y se alimentaron con medio de cultivo que contenía adenina, aminopterina y timidina (AAT, disponible en Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO). Los cultivos resistentes a AAT se cribaron por ELISA o citometría de flujo como se ha descrito anteriormente para unión a células Sp35-COS-7 o a Sp35-Fc. Los hibridomas positivos se subclonaron adicionalmente por dilución limitante.

Se aislaron diecisiete líneas celulares de hibridoma que producían anticuerpos monoclonales producidos a partir de ratones inmunizados con Sp35-Fc. Las propiedades de los anticuerpos monoclonales derivados de los hibridomas se muestran en las Tablas 3A y 3B.

Los polinucleótidos que codifican los dominios variables ( $V_H$  y  $V_L$ ) de los anticuerpos monoclonales 1A7, 2F3, 3P1D10.2C3 y 3P1E11.3B7 se aislaron por PCR, se clonaron y se sometieron a análisis de secuencia por el método siguiente. Se extrajo el ARN total de células de hibridoma usando el mini kit RNeasy® de Qiagen® y se generó ADNc a partir del ARN aislado por RT PCR, usando condiciones estándar. Se usó una mezcla de cebadores para la RT-PCR. Un conjunto preferido de cebadores incluyó un cebador con el 5' del cebador que hibrida con la secuencia señal y el extremo 3' del cebador que hibrida con el dominio constante 3' de la unión FR4/dominio constante. Esto permite la amplificación de un dominio variable intacto sin ambigüedades acerca del extremo N y la unión V/C del anticuerpo monoclonal. Un experto en la técnica reconocerá los conjuntos de cebadores que se necesitan modificar para amplificar diferentes moldes y para diferentes condiciones de PCR. Ocasionalmente, puede producirse la presencia muy abundante de mensajes no productivos (por ejemplo, la cadena ligera no productiva con marco modificado CDR3-FR4 de la pareja de fusión) o mensajes productivos no específicos y complica la clonación de las cadenas variables. Una solución es usar datos de secuencia N-terminal del anticuerpo auténtico purificado para diseñar un cebador degenerado para permitir la clonación. Alternativamente, se puede usar cebadores "de marco universal", tales como los descritos en Orlandi et al, PNAS 86: 3833 (1989), que "fijan" el extremo N y C de los dominios variables (es decir, el extremo N de FR1 y el extremo C de FR4 se determinan por el cebador).

Además, pueden obtenerse datos de la secuencia, para diseñar cebadores más eficaces, a partir de los productos en masa de RT-PCR que se han purificado en gel y secuenciado. El producto de PCR también puede subclonarse usando, por ejemplo, el Kit de Clonación TOPO (Invitrogen) y secuenciarse. Los datos de la secuencia se obtienen a partir de múltiples subclones independientes o fragmentos purificados en gel para establecer firmemente la secuencia consenso.

La secuencia de la cadena ligera de P1E11.3B7 se determinó usando una mezcla de cebadores 5' de la secuencia señal de la cadena ligera kappa murina: (i) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GGA TTT TCA GGT GCA GAT TTT CAG 3' (SEQ ID NO: 356), (ii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GRA GTC ACA KAC YCA GGT CTT YRT A 3' (SEQ ID NO: 357), (iii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GAA GTT GCC TGT TAG GCT GTT G 3' (SEQ ID NO: 358) y (iv) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GAG GKC CCC WGC TCA GYT YCT KGG A 3' (SEQ ID NO: 359), con un único cebador 3' de dominio constante kappa murino: 5' GCG TCT AGA ACT GGA TGG TGG GAG ATG GA 3' (SEQ ID NO: 4), en los que K= G/T, R= A/G, W= A/T e Y= C/T. El producto de PCR resultante se subclonó y se secuenciaron múltiples subclones independientes. La secuencia consenso deducida fue consistente con los datos de secuenciación por degradación de Edman. La secuenciación indicó que el cebador 5' de la secuencia señal degenerada 5' GGG GAT ATC CAC CAT GRA GTC ACA KAC YCA GGT CTT YRT A 3' (SEQ ID NO: 357) fue el que había rendido el dominio variable de la cadena ligera de 3P1E11.3B7 durante la amplificación.



La secuencia de la cadena pesada de 3P1E11.3B7 se determinó usando una mezcla de cebadores de PCR 5' de la secuencia señal de la cadena pesada murina: (i) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GGR ATG SAG CTG KGT MAT SCT CTT 3', (SEQ ID NO: 360) (ii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GRA CTT CGG GYT GAG CTK GGT TTT 3' (SEQ ID NO: 361), y (iii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GGC TGT CTT GGG GCT GCT CTT CT 3' (SEQ ID NO: 362), con un cebador 3' del dominio constante de IgG CH1 murino degenerado 5' AGG TCT AGA AYC TCC ACA CAC AGG RRC CAG TGG ATA GAC 3' (SEQ ID NO: 363), en los que K= G/T, M= A/C, R= A/G e Y= C/T. La PCR usando esta mezcla de cebadores, con una variedad de diferentes condiciones de ciclación, no rindió una secuencia de dominio variable de la cadena pesada en el que el extremo N deducido fuera consistente con el determinado por la secuencia de degradación de Edman del anticuerpo 3P1E11.3B7 purificado. Por lo tanto, usamos los cebadores universales de cadena pesada: FR1 5' AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G 3' (SEQ ID NO: 364) y FR4 5' TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA G 3' (SEQ ID NO: 365), en los que M= A/C, R= A/G, S= C/G y W= A/T. Este conjunto rindió un dominio variable de la cadena pesada murina cuya secuencia deducida fue consistente con los datos empíricos de 3P1E11.3B7.

Con el fin de verificar que los extremos N y C del dominio variable de la cadena pesada eran auténticos y no determinados por el cebador, se realizó otra reacción de PCR con un cebador de secuencia señal degenerado 5' ATG GAR TGY AAY TGG ATH CTN CCN TTY A 3' (SEQ ID NO: 366) y el cebador 3' del dominio constante mencionado anteriormente 5' AGG TCT AGA AYC TCC ACA CAC AGG RRC CAG TGG ATA GAC 3' (SEQ ID NO: 367), en los que H= A/C/T, N= A/C/G/T, R= A/G e Y= C/T. El diseño del cebador de la secuencia señal degenerado se basó en secuencias señal de los mejores aciertos derivados de una búsqueda TFasta de la base de datos de secuencias de roedor Genbank en la que se buscó la secuencia consenso deducida FR1 de 3P1E11.3B7 de la reacción de PCR con el "cebador universal" descrito anteriormente. Esta PCR rindió un producto con un dominio variable de la cadena pesada murino completo.

Los dominios variables murinos de 3P1E11.3B7 completos se usaron (con mutagénesis silenciosa según fue necesario para introducir sitios de restricción) conjuntamente con ADNc de IgG1 humana y dominio constante kappa para construir ADNc quiméricos de cadena pesada y ligera, respectivamente. Los ADNc de inmunoglobulina de longitud completa se subclonaron en un vector de expresión denominado pNE001, un derivado del vector de expresión episomal de células de mamífero EBV comercial, pCEP4. Los vectores de expresión de cadena pesada y ligera (denominados pXW372 y pXW363, respectivamente) se co-transfectaron en células 293-EBNA. Los análisis por transferencia western (probados con reactivos específicos de IgG humana) del medio condicionado de células transfectadas temporalmente confirmaron la expresión de mAb quimérico 3P1E11.3B7-hulgG1, kappa. Las secuencias polipeptídicas VH y VL de 3P1E11.3B7 resultantes se muestran en las Tablas 6 y 8 y son SEQ ID NOs: 173 y 209, respectivamente. Las secuencias de cadena pesada y ligera para los anticuerpos monoclonales 1A7, 2F3 y 3P1D10.2C3 se determinaron mediante métodos similares.

#### C. Identificación de anticuerpos monoclonales anti-Sp35 por exposición en fagos

Los fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal anti-Sp35 se identificaron y aislaron de bibliotecas de exposición en fagos como se describe en Hoet *et al.*, *Nat. Biotech.* 23: 344-348 (2005); Rauchenberger, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278: 194-205 (2003); y Knappik, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296: 57-86 (2000).

La biblioteca de exposición en fagos MorphoSys Fab HuCAL® GOLD ("Biblioteca de Exposición en Fagos-2" en la Tabla 3B), que comprende regiones variables de anticuerpo sintético humanizado se cribaron frente a proteína Sp35-Fc soluble humana recombinante por métodos de cribado ELISA e IHC estándar. Véase, por ejemplo, Ostendorp, R., Frisch, C. y Urban, M., "Generation, engineering and production of human antibodies using HuCAL®". *Antibodies, Volumen 2 Novel Technologies and Therapeutic Use*. Nueva York: Kluwer Academic/Plenum 13-52 (2004). Los fagos Fab que se unieron específicamente a Sp35 se purificaron y caracterizaron. Las propiedades de estos fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal derivados de exposición en fagos se muestran en la Tabla 3B como "fragmentos Fab monoclonales derivados de la biblioteca de exposición en fagos-2". El fago Fab 1968 aislado se seleccionó para análisis adicional.

#### 45 Ejemplo 4

##### Inmunoprecipitación de Sp35 por anticuerpos monoclonales anti-Sp35

Para realizar la inmunoprecipitación, se produjeron células COS-1 que expresan Sp35, fusionadas a una etiqueta de hemaglutinina (HA) en el extremo N, por transfección temporal de células COS-1 con una construcción de ADN que expresa la proteína Sp35 de longitud completa con una etiqueta HA. Las células se recogieron 48 hr después de la transfección y se lisaron en 1 ml de tampón de lisis (50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1% Tritón X-100 y 10% glicerol) durante 30 min a 4°C. Después de centrifugar a 14.000xg durante 15 min, los sobrenadantes se incubaron con lechos de ProteínaA/G-Sefarosa (Santa Cruz) a 4°C durante 1 hr y se incubaron a 4°C durante 1 hr bien con el anticuerpo monoclonal murino anti-Sp35 1A7 o el 2F3. Los lechos se lavaron 3 veces con tampón de lisis, se hirvieron en tampón de muestra Laemmli, se sometieron a SDS-PAGE 4-20% y se analizaron por

transferencia Western usando un anticuerpo que reconoce la etiqueta HA. Como se muestra en el gel SDS-PAGE, los anticuerpos monoclonales 1A7 y 2F3, inmunoprecipitaron Sp35 humano y murino (Fig. 1). Como se muestra en la Fig. 1, el anticuerpo monoclonal 2F3 inmunoprecipitó fuertemente tanto Sp35 humano como murino, mientras que el anticuerpo monoclonal 1A7, que inmunoprecipitó fuertemente Sp35 humano, reconoció la proteína Sp35 murina sólo débilmente. De manera similar, los anticuerpos monoclonales 1G7, 2B10, 2F3, 3P4C2.2D2, 3P4C8.2G9, Li01, Li03, Li05, Li06, Li07, Li08, Li11 y Li12 inmunoprecipitaron Sp35 humano o de ratón o humano y de ratón (Véase la Tabla 3B). Además, Li08 inmunoprecipita Ap-Sp35 y los anticuerpos monoclonales 1B6.4 y 3E3.1 inmunoprecipitan Sp35 endógeno (Véase la Tabla 3B).

#### Ejemplo 5

10 El anticuerpo anti-Sp35 se une específicamente a Sp35 determinado por ELISA

Con el fin de determinar qué regiones del polipéptido Sp35 se unían por los diferentes anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma y exposición en fagos producidos en el Ejemplo 2, se realizó un ensayo ELISA usando un panel de polipéptidos Sp35 truncados, cada uno fusionado a las regiones bisagra y Fc de IgG1 mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1. El panel consistió en los fragmentos de Sp35 siguientes: aminoácidos 34-425 de SEQ ID NO: 2, aminoácidos 417-532 de SEQ ID NO: 2, aminoácidos 417-493 de SEQ ID NO: 2 y aminoácidos 34-532 de SEQ ID NO: 2. Como controles se usaron ovoalbúmina y BSA. Como se muestra en la Tabla 3B, los mAbs derivados de hibridoma 2F3, 2B10, 3A3, 3P4c2.2d2 y 3P4c8.2g9, y los mAbs derivados de fago Fab 3383, 3563, 3564, 3565, 3568, 3569, 3570 y 3582 todos se unieron específicamente a los fragmentos de Sp35 1-417 y 1-534, lo que sugiere que estos anticuerpos se unen a epítomos en la región LRR de Sp35. Los mAbs derivados de hibridoma 1A7, 3P1B11F9, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C63G10.2H7, 2P2C9.2G4, 3P4A61D9 y 394C51D8 y los mAbs derivados de Fab fago 3495, 3566, 3567 y 1968 se unieron específicamente al fragmento de Sp35 34-532 y se unieron débilmente al 417-532 de Sp35, lo que sugiere que estos anticuerpos se unen probablemente a epítomos que al menos incluyen una parte del extremo C de la región LRR de Sp35. En experimentos similares, estos últimos anticuerpos también se unieron específicamente a un polipéptido Sp35 que consistía en los aminoácidos 34-534 de Sp35 humano y con baja afinidad a Sp35 de ratón y rata. La afinidad de estos últimos anticuerpos para Sp35 de ratón y rata se restauró al nivel observado usando Sp35 humano cuando el aminoácido 419 de Sp35 de ratón o rata se cambia de histidina (H) a arginina (R). La arginina es el aminoácido en la posición 419 en Sp35 humano. Se determinó que la  $K_D$  para el anticuerpo monoclonal 1A7 es 10 nM ( $1 \times 10^{-9}$  M) para la unión a Sp35 humano y 20  $\mu$ M ( $2 \times 10^{-5}$  M) para la unión a Sp35 murino. Para ELISA Ap-Sp35 para detectar los anticuerpos unidos a la región 417 a 532, el ELISA se realizó como sigue: Los Mab se recubrieron en placas de ELISA, se incubaron bien con una proteína de fusión Sp35-AP a 4°C toda la noche seguido de anti-humano ligado a AP (H+L) (1:5.000, Jackson ImmunoResearch) a RT durante 1 hr, o con AP-proteínas de fusión a 4°C toda la noche. El sustrato AP se desarrolló con 10 mg/ml 4NPP en 0,1 M Glicina, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $ZnCl_2$ , pH 10,5 y se leyó a D.O. 405.

#### Ejemplo 6

El anticuerpo anti-Sp35 se une específicamente a Sp35 determinado por FACS

35 Para caracterizar adicionalmente las propiedades de unión de los Maba anti-Sp35 derivados de hibridoma 1A7 y 2F3 producidos como se describe en el Ejemplo 3, se comparó la unión a células COS-7 ó 293 tanto fijadas como vivas que expresan Sp35 de ratón o humano. Las células transfectadas y no transfectadas con Sp35 se fijaron y se sometieron a análisis FACS (FACS: Las células transfectadas con Sp35 humano o de ratón o vector control se disociaron de las placas de cultivo, se lavaron con 2% FBS/PBS y se incubaron con anticuerpo primario a 1  $\mu$ g/ml en hielo durante 1 hr. Las células se lavaron 3 veces con 2% FBS/PBS y se incubaron con anticuerpo secundario marcado con PE (1:100, JacksonImmunoResearch) en hielo durante 30 min. Después de 2 lavados con 2% FBS/PBS, las células se fijaron en 2% PFA y se sometieron a análisis FACS por PE). El resultado de FACS mostró que los Mabs 1A7 y 2F3 se unían a células COS-7 y 293 que expresaban Sp35 pero no se unían a las células control sin expresión de Sp35 (Fig. 2).

#### Ejemplo 7

45 Ensayo de crecimiento de neuritas

Para ensayar la capacidad de los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma y derivados de Fab-fago producidos anteriormente para revertir el efecto inhibitorio de los inhibidores de mielina del SNC, por ejemplo, OMgp, en neuronas, se recubrieron portas de cultivo Lab-Tek® (4 pocillos) con 0,1 mg/ml poli-D-lisina (Sigma®). Ap-OMgp (1  $\mu$ g/mancha) o PBS se distribuyeron como gotas de 3  $\mu$ l. Los portas Lab-Tek® se lavaron y recubrieron con 10  $\mu$ g/ml laminina (Gibco™). Se disociaron los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de crías de rata Sprague Dawley P6-7 con 1 mg/ml colagenasa tipo 1 (Worthington), se trituraron con pipetas Pasteur pulidas al fuego, se pre-plaquearon para enriquecimiento en células neuronales y finalmente se plaquearon a 10.000 células/pocillo en los portas de cultivo pre-recubiertos Lab-Tek®. Se añadieron diez  $\mu$ g/ml de mAb 1A7 ó 2F3 inmediatamente después de plaquear los DRG. El medio de cultivo fue F12

(disponible en Gibco/Invitrogen) que contenía 5% suero de caballo donante inactivado con calor, 5% suero fetal bovino inactivado con calor y 50 ng/ml factor de crecimiento nervioso de ratón (NGFm) y se incubó a 37<sup>0</sup>C y 5% CO<sub>2</sub> durante 6 horas. Después de la incubación, los portas se fijaron en 4% paraformaldehído/20% sacarosa y se tiñeron con anticuerpo anti-βIII-tubulina TUJ1 (Covance) después de 16 horas.

5 Se añadió a los portas como anticuerpo secundario anti-ratón Alexa- Fluor® 594 (Molecular Probes) diluido 1:300 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Los portas se cubrieron con cubreobjetos con Gel/Mount™ (Biomedica™). Se adquirieron imágenes digitales 5x con software OpenLab™ (Improvision, Inc., Lexington, MA) y todas las imágenes se analizaron para la cuantificación de crecimiento de neuritas usando software OPENLAB™, todo según los parámetros especificados por el fabricante.

10 Los dos MABs, 1A7 y 2F3, protegieron a las neuronas DRG de la inhibición del crecimiento de las neuritas mediada por OMgp (Fig. 3).

#### Ejemplo 8

El anticuerpo monoclonal 1A7 estimula la recuperación funcional en el modelo de Lesión de Médula Espinal en la rata

15 Se indujo lesión en la médula espinal ("SCI") por hemi-sección dorsal como sigue, modificado a partir de los métodos descritos previamente (Li, S. *et al.*, *J. Neurosci.* 24, 10511-10520 (2004)). Se proporcionó a ratas hembra Long Evans (7 semanas de edad, Charles River) anestesiadas analgesia pre-operatoria (Buprenorfina/Buprenex, 0,05 mg/kg s.o.) y tranquilizantes (Midazolam, 2,5 mg/kg i.p.) y se realizó una hemi-sección dorsal en las vértebras torácicas 6/7 interrumpiendo completamente el tracto dorsomedial principal y corticoespinal dorsolateral (CST). Los componentes dorsal y dorso-lateral del tracto corticoespinal (CST) se interrumpieron completamente y la parte ventral del CST se dejó  
20 intacta. El puente de tejido ventral que permaneció después de la hemi-sección constituía aproximadamente el 20% de la médula en ambos grupos de tratamiento (datos no mostrados).

La función de las extremidades posteriores se cuantificó usando el método de puntuación de campo abierto de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) (Eby, M.T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275, 15336-15342 (2000) y todos los animales sufrieron déficits funcionales marcados después de SCI, con una parálisis casi completa de las extremidades posteriores el día posterior a la cirugía. Inmediatamente después de la transección CST, se insertó un catéter intratecal en el espacio subaracnoide en T7 y se conectó a una bomba mini-osmótica cebada (Alzet modelo 2004, Alza Corp) insertada en el espacio subcutáneo. Las bombas mini-osmóticas administraron proteína control de isotipo IgG humana (5 mg/ml) o anticuerpo monoclonal 1A7 (4,8 mg/ml) continuamente a una velocidad de 0,25 µl/h durante 5 semanas. Los animales control (tratados con IgG humana) recuperaron una función sustancial durante las 5 semanas de duración del experimento, pero alcanzaron un  
25 plató a las 3-4 semanas, consiguiendo finalmente una puntuación BBB media de 9 ± 0,45 (Fig. 7). Por el contrario, la infusión intratecal continua de 1A7 durante 5 semanas después de la transección de la médula espinal resultó en unas puntuaciones BBB significativamente mejoradas sobre los animales control en las 5 semanas con una mejora continuada de la función en el marco de tiempo de 2-5 semanas, alcanzando una puntuación BBB media de 11,1 ± 0,7 (Fig. 4). Estos resultados demuestran que el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-Sp35 1A7 estimuló la recuperación de la función después de la lesión en la médula espinal como se demuestra por un incremento en la puntuación BBB, regeneración de axones y menor retracción de axones observadas por tinción inmunohistoquímica de los axones.

#### Ejemplo 9

Los anticuerpos anti-Sp35 1A7, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 6P4F4.1D3, 6P4F4.1F9, 7P1D5.1G9, Li05, Li06, Li08, Li13, Li28, Li33, D05 y D08 estimulan la mielinización *in vitro*

40 El papel de los anticuerpos anti-Sp35 1A7 y 2F3 en la mielinización se investigó *in vitro* tratando co-cultivos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) y oligodendrocitos con los anticuerpos anti-Sp35 1A7 y 2F3 y ensayando para la mielinización por inmunohistoquímica y transferencia Western. Para estos estudios, fue necesario generar en primer lugar cultivos primarios de neuronas DRG y de oligodendrocitos.

45 Se cultivaron ganglios de la raíz dorsal embrionarios de rata hembra Long Evans E14-E17 como se describe por Plant *et al.*, *J. Neurosci.* 22: 6083-91 (2002). Los DRG diseccionados se plaquearon en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (100 µg/ml) durante 2 semanas. Las células se incubaron en presencia de fluorodesoxiuridina durante los días 2-6 en medio NLA que contenía 1 x B27, 100 ng/ml NGF (Gibco) durante los días 8-11.

50 Se cultivaron oligodendrocitos de ratas hembra Long Evans en el día 2 post-natal (P2) como se describe por Conn, *Meth. Neurosci.* 2: 1-4 (Academic Press; 1990) con modificaciones como sigue. Brevemente, se extirpó el posencéfalo de ratas P2 y se puso en medio HBSS frío (Gibco). Los fragmentos tisulares se cortaron en partes de 1 mm y se incubó a 37<sup>0</sup>C durante 15 min en 0,01% tripsina y 10µg/ml ADNasa. Las células disociadas se plaquearon en frascos de cultivo tisular T75 recubiertos con poli-L-lisina y se crecieron en DMEM con 20% suero bovino fetal a 37<sup>0</sup>C durante 10 días. Los

oligodendrocitos positivos para A2B5 se recogieron agitando los frascos toda la noche a 200 rpm a 37°C. Los oligodendrocitos A2B5 se cultivaron durante 7 días en DMEM (Gibco) que contenía 25 mM D-glucosa, 4 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 50 µg/ml apo-transferrina humana, 5 µg/ml insulina pancreática bovina, 30 nM selenato de sodio, 10 nM hidrocortisona, 10 nM D-biotina, 1 mg/ml BSA, 10 ng/ml FGF y PDGF (Peprotech). Las células se recogieron por tripsinización. Las células se co-cultivaron con las neuronas DRG en presencia o ausencia de 1, 3, 10 ó 30 µg/ml de los anticuerpos monoclonales anti Sp35 1A7 ó 2F3, o un anticuerpo control negativo en medio NLA que contenía 2% suero fetal bovino, 50 µg/ml ácido ascórbico, 100 ng/ml NGF (Gibco). Se ha determinado que una dosis eficaz de anticuerpo para administrarse en dicho ensayo está en el intervalo de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml, dependiendo del anticuerpo. Un experto en la técnica será capaz de determinar una dosis eficaz usando los ensayos descritos en la presente memoria.

El medio de cultivo se cambió y los diferentes anticuerpos monoclonales se repusieron cada tres días. Después de 30 días a 37°C, las células co-cultivadas se tiñeron por tinción inmunohistoquímica ("IHC") para neurofilamentos con anticuerpo anti-βIII-tubulina para identificar axones o anticuerpo anti-MBP para identificar oligodendrocitos (Fig. 4A-E). Las células co-cultivadas también se lisaron y se sometieron a análisis por transferencia Western para cuantificar la MBP (Fig. 4G). Tomando como base los análisis IHC y transferencia Western, las células co-cultivadas tratadas con los anticuerpos anti-Sp35 1A7 y 2F3 mostraron una supervivencia incrementada de oligodendrocitos y neuronas, números incrementados de axones empaquetados y números incrementados de células positivas para MBP (Fig. 4F, 10 veces más células positivas para MBP cuando se compara con co-cultivos tratados con anticuerpo control).

En un experimento similar, se incubaron co-cultivos de oligodendrocitos y DRG en presencia o ausencia de los anticuerpos anti-Sp35 Li05 y Li06 o un anticuerpo control negativo. Las células co-cultivadas se lisaron y se sometieron a análisis por transferencia Western para cuantificar la MBP (Fig. 8). Tomando como base los análisis por transferencia Western, las células co-cultivadas tratadas con los anticuerpos anti-Sp35 Li05 y Li06 mostraron números incrementados de células positivas para MBP, similares a células co-cultivadas tratadas con 3, 10 y 30 µg de Sp35-Fc (LINGO-1-Fc).

En experimentos similares, se incubaron co-cultivos de oligodendrocitos y DRG en presencia o ausencia de los anticuerpos anti-Sp35 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 6P4F4.1D3, 6P4F4.1F9, 7P1D5.1G9, Li08, Li13, Li28 y Li33 y también estimularon la mielinización. De manera similar, los anticuerpos de longitud completa D05 y S08 también estimularon la mielinización.

Estos resultados indicaron que el tratamiento de co-cultivos de DRG-oligodendrocitos con los anticuerpos anti-Sp35 1A7, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 6P4F4.1D3, 6P4F4.1F9, 7P1D5.1G9, Li05, Li06, Li08, Li13, Li28, Li33, D05 y D08 estimuló las interacciones de axones de oligodendrocitos maduros y la mielinización comparado con co-cultivos tratados con anticuerpo control.

#### Ejemplo 10

El anticuerpo anti-Sp35 1A7 estimula la supervivencia de oligodendrocitos y mielinización *in vivo*

Se alimentaron ratones macho adultos C57B1/6 de tipo salvaje con cuprizona (0,2% molido con pienso de ratón picado en peso) durante 6 semanas para inducir la desmielinización en el cuerpo calloso según el método descrito por Morell *et al.*, *Mol Cell Neurosci.* 12: 220-7 (1998). Brevemente, el anticuerpo monoclonal anti-Sp35 1A7 se inyectó estereotácticamente en el cuerpo calloso desmielinizante en las semanas 2, 2,5 y 3 semanas de alimentación con cuprizona, por el método descrito más adelante. A los ratones control se les inyectó estereotácticamente en los mismos intervalos medio esterilizado que contenía anticuerpo control. Después de que las 6 semanas de alimentación con cuprizona se hubieron completado, los ratones volvieron a la dieta normal durante 2, 4 y 6 semanas (sólo pienso de ratón picado) para permitir la remielinización.

Los anticuerpos monoclonales 1A7 y control se administraron como sigue. Los ratones tratados con cuprizona se anestesiaron con ketamina (80 mg/kg de peso corporal) y xilazina (10 mg/kg de peso corporal) y se pusieron en un aparato de inmovilización diseñado para cirugía estereotáctica (David Kopf Instruments). Se abrió el cuero cabelludo y se inyectaron los compuestos estériles (1 µM en 1 ml de HBSS) unilateralmente en el cuerpo calloso fuertemente desmielinizado del ratón receptor de tipo salvaje con una jeringa Hamilton de 10 µl usando coordenadas estereotácticas de 0,7 mm posterior y 0,3 mm lateral al bregma a una profundidad de 1,7 mm (Messier *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63: 313-18 (1999)). A los ratones receptores control adicionales se les inyectó estereotácticamente HBSS que no contenía compuestos. La apertura en el cráneo se rellenó con Gelfoam y el área se frotó con penicilina y estreptomina (Gibco) y la herida se suturó. Los ratones se sacrificaron cada semana del experimento después de la inyección y sus cerebros se extrajeron y procesaron para análisis molecular, bioquímico e histológico.

Los animales que recibieron tratamiento con el anticuerpo anti-Sp35 1A7 mostraron una supervivencia incrementada de oligodendrocitos maduros (basado en tinción de anticuerpos CC1, Fig. 5A) y mielinización de axones por IHC usando

anticuerpo anti-proteína MBP o luxol fast blue (Fig 5B). Los oligodendrocitos positivos para el anticuerpo CC1 se cuantificaron a las cuatro semanas y 6 semanas (Fig. 5C). Estos resultados indicaron que el tratamiento con el anticuerpo anti-Sp35 1A7 estimuló la supervivencia de oligodendrocitos maduros y la mielinización de axones comparado con ratones tratados con anticuerpo control. De manera similar, los animales que recibieron el anticuerpo 1A7 en un modelo de lisolecitina de desmielinización también estimuló la mielinización de axones comparado con los animales control (datos no mostrados).

#### Ejemplo 11

El anticuerpo anti-Sp35 1A7 estimula la supervivencia de células del ganglio retinal (RGC) en el modelo de transección del nervio óptico

El anticuerpo anti-Sp35 1A7 se ensayó en un modelo de transección del nervio óptico, que investiga factores que afectan la función neuronal. Se usaron en este estudio ratas hembras adultas jóvenes Sprague Dawley (SD). El nervio óptico derecho de cada animal se transeccionó intraorbitalmente 1,5 mm desde el disco óptico. Se aplicó una pieza de gelfoam empapada con 6% Fluoro-Gold (FG) al sitio recién transeccionado justo detrás del disco óptico para marcar las células del ganglio retinal (RGC) supervivientes. Los animales se dividieron en tres grupos (n= 6 en cada grupo) que recibieron bien el anticuerpo anti-Sp35 1A7, anticuerpo control o sólo PBS, por inyección intravítrea. El volumen de cada inyección intravítrea fue 4 µl mientras que la dosificación de cada inyección fue 2 µg. Las inyecciones intravítreas se realizaron inmediatamente después de la transección del nervio óptico.

Se permitió que todos los animales sobrevivieran durante 1 semana. Dos días antes de sacrificar a los animales, el nervio óptico izquierdo de cada animal se transeccionó y se administró 6% FG como se ha descrito anteriormente para marcar las RGC supervivientes, para que sirva como el control interno. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de Nembutal y las retinas se diseccionaron en 4% paraformaldehído. Se hicieron cuatro cortes radiales para dividir las retinas en cuatro cuadrantes (superior, inferior, nasal y temporal). Las retinas se fijaron posteriormente en el mismo fijador durante 1 hora antes de montarlas horizontalmente con medio de montaje (Dako). Los portaobjetos se examinaron en un microscopio de fluorescencia usando un filtro ultravioleta (longitud de onda de excitación= 330-380 nm). Las RGC marcadas se contaron a lo largo de la línea media de cada cuadrante empezando desde el disco óptico hasta el borde periférico de la retina a intervalos de 500 µm, bajo una cuadrícula ocular de 200 X 200 µm<sup>2</sup>. El porcentaje de RGC supervivientes que resultó de cada tratamiento se expresó comparando el número de RGC supervivientes en los ojos lesionados con sus ojos contra-laterales. Todos los datos se expresaron como media ± SEM. La significancia estadística se evaluó por ANOVA de una vía, seguido de un ensayo post hoc de Tukey-Kramer. Las diferencias se consideraron significativas para p<0,05. Los animales tratados con el anticuerpo anti-Sp35 1A7 mostraron más supervivencia neuronal (80%) cuando se comparan con los animales tratados con el anticuerpo control o PBS, mostrando cada uno sólo aproximadamente 50% de supervivencia neuronal (Fig. 6).

#### Ejemplo 12

Ensayo de los anticuerpos Sp-35 para remielinización en el modelo de aplastamiento del nervio óptico

El nervio óptico derecho recibe aplastamiento completo con forceps #5 durante 10 segundos alrededor de 1,5 mm por detrás del globo ocular intraorbitalmente justo antes de la administración de 2 µl del anticuerpo monoclonal 1A7, 2F3, Li05 y Li06 en 2 ml por inyección intravítrea.

Los animales reciben una segunda inyección intravítrea del mismo tratamiento una semana después de la cirugía. Dos semanas después de la cirugía, los animales se perfunden con fijadores EM, se fijan posteriormente y se procesan para secciones semidelgada y ultradelgada. Las secciones longitudinales del nervio óptico se tiñen y se preparan para observación de mielina. La mielinización de las partes próxima y distal del nervio óptico aplastado se comparan entre los diferentes grupos de tratamiento. Los animales tratados con Sp35-Fc y 1A7, 2F3, Li05 y Li06, así como los controles apropiados, se analizarán para remielinización en la parte distal del nervio óptico comparado con los controles.

#### Ejemplo 13

Ensayo de los anticuerpos anti-Sp35 para regeneración de axones en el modelo de aplastamiento del nervio óptico

El nervio óptico derecho se aplastó con forceps #5 durante 10 segundos alrededor de 1,5-2 mm por detrás del globo ocular intraorbitalmente justo antes de la administración de 2 µg del anticuerpo monoclonal 1A7 en PBS mediante inyección intravítrea. Se ensayaron 4 ratas con el anticuerpo 1A7 y se usaron 8 ratas como animales control. Los animales recibieron una segunda inyección intravítrea del mismo tratamiento una semana después de la cirugía. Tres días antes del sacrificio de los animales de ensayo (día 11 del experimento), se inyectaron intravítreamente 2 ml de CTB-FITC para marcar, anterógrado, los axones del nervio óptico regenerativos. En el día 14 después de la cirugía, los animales se perfundieron y fijaron posteriormente. El nervio óptico aplastado se procesó para secciones longitudinales

congeladas. Los axones marcados con CTB-FITC, que cruzan el sitio de la lesión, se contaron como fibras regenerativas a varias distancias más allá del sitio de aplastamiento. Cuando 1A7 se inyectó en el ojo, la regeneración de los axones se observó hasta 250  $\mu\text{m}$  más allá del sitio de aplastamiento. Véase la Fig. 10.

Ejemplo 14

- 5 Los anticuerpos anti-Sp35 estimulan la remielinización y reparación en el nervio óptico usando el modelo EAE inducido por MOG en rata

Para estos experimentos, se usó el modelo de Encefalomiélitis Autoinmune Experimental (EAE) inducida por Glicoproteína Mielínica de Oligodendrocitos (MOG) en rata. Éste es el modelo animal para la esclerosis múltiple humana. Se emulsionaron 50  $\mu\text{l}$  de 200 ng de adyuvante completo de Freund (Chondrex Inc.) más 50  $\mu\text{l}$  de 50  $\mu\text{g}$  MOG en disolución salina (1:1) y se mantuvo en hielo antes de inyectarlo intradérmicamente en la base de la cola de cada animal. Para todos los experimentos se usaron ratas hembra marrones Norway, de 8-10 semanas de edad. La observación general en la técnica indica que el modelo de EAE se induce aproximadamente 15 días después de la inyección de MOG. Las ratas se puntuaron para signos clínicos de EAE. Los signos se puntuaron como sigue: grado 0,5, paresia distal de la cola; grado 1, parálisis completa de la cola; grado 1,5, paresia de la cola y paresia leve de la pata trasera; grado 2,0, paresia unilateral grave de la pata trasera; grado 2,5, paresia bilateral grave de la extremidad posterior; grado 3,0, parálisis bilateral completa de la extremidad posterior; grado 3,5, parálisis bilateral completa de la extremidad posterior y paresia de una extremidad anterior; parálisis de grado completo (tetraplejía), estado moribundo o muerte. Los animales reciben tratamiento una vez que se induce el modelo de EAE.

Se inyectaron intravítreamente 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de anticuerpo anti-Sp35 (1A7) en el día 15 después de la inducción de EAE por MOG. Se inyectaron 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  del anticuerpo anti-Sp35, 1A7, dos veces adicionales en el día 22 y día 28. Después de la finalización del experimento, los animales se perfundieron con 4% PFA. Los nervios ópticos se fijaron posteriormente en 1%  $\text{OsO}_4$ , se deshidrataron y se incluyeron en Epon. Se cortaron secciones semidelgadas (1  $\mu\text{M}$ ) y se tiñeron con azul de Toluidina para evaluación de mielinización. Los nervios ópticos de los animales tratados se compararon con los animales no tratados para regeneración de axones y remielinización en el nervio óptico. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo un protocolo aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de animales (IACUC).

Los animales que reciben tratamiento con el anticuerpo anti-Sp35 1A7 mostraron remielinización y reparación del nervio óptico comparado con los nervios ópticos normales o animales que se sometieron a EAE inducida por MOG, pero que no recibieron tratamiento (Fig. 9). En la Fig. 9C, las flechas apuntan a los exones mielinizados. Los animales que reciben un anticuerpo que reconoce el dominio III de la Proteína G de *Streptococcus* (MOPC21), no específico para Sp35, no mostraron signos de remielinización o reparación del nervio óptico comparado con los nervios ópticos normales o los nervios ópticos de los animales no tratados (datos no mostrados). El anticuerpo antagonista de Sp35 1A7 estimuló la remielinización y reparación de los nervios ópticos en un modelo de neuritis óptica de EAE inducida por MOG en rata (Fig. 9).

Ejemplo 15

- 35 Ensayo de los anticuerpos anti-Sp35 para estimulación de la remielinización del SNC usando el modelo de EAE inducida por MOG en ratón

La EAE se induce en la cepa de ratón mixta 129B6 por inmunización intradérmica (día 0) con 100  $\mu\text{g}$  de proteína MOG1-125 emulsionada con adyuvante completo de Freund (CFA). El volumen inyectado es 100  $\mu\text{l}$  por ratón y se distribuye en 3 sitios (pabellón auricular, espalda y piel). La emulsión se prepara en la base de una proporción de volumen 1:1 y contiene 1 mg/ml MOG1-125 y 2 mg/ml *M. tuberculosis* (cepa H37Ra, Chondrex). Se administra intraperitonealmente toxina pertussis (200 ng/ratón) en el momento de la inmunización y 2 días posteriormente. El peso corporal y las puntuaciones clínicas de EAE (0= sin signos clínicos; 1= cola flácida; 2= debilidad en las extremidades posteriores, reflejo de enderezamiento alterado o marcha inestable; 3= parálisis completa de las extremidades posteriores o reflejo de enderezamiento ausente; 4= parálisis completa de las extremidades posteriores con algún grado de implicación de las extremidades anteriores; 5= animal totalmente paralizado; 6= moribundo o muerto) se registran diariamente. Todos los procedimientos se realizan siguiendo un protocolo aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de animales (IACUC). Los animales reciben el tratamiento con los anticuerpos monoclonales 1A7, 2F3, Li05 y Li06 o anticuerpo control en el día 0 del estudio. Se toman muestras de sangre a diferentes tiempos a lo largo de los experimentos por la técnica de sangrado retro-orbital. El plasma se separa de PBMC por centrifugación y se realiza el fenotipado celular por tinción FACS. El perfilado de la respuesta humoral de anticuerpo anti-MOG se realiza por ELISA usando mAbs específicos de subclase/isotipo (Pharmingen). Al final de cada experimento, se recogen el cerebro, médula espinal, nervios ópticos y nervios ciáticos después de la perfusión.

## ES 2 434 470 T3

Este mismo protocolo se usa para inducir la EAE en ratones con Sp35 inactivado y compañeros de camada. Los ratones con Sp35 inactivado muestran típicamente una puntuación EAE menor (1,5) y sin recaída comparado con el control (durante un periodo de 45 días), después compañeros de camada de tipo salvaje (puntuación EAE 3,5).

Los animales tratados con Sp35-Fc y 1A7, 2F3 se analizarán para remielinización comparando con el control.

- 5 La proteína MOG<sub>1-125</sub> etiquetada con His se expresó en *Pichia pastoris* usando un promotor TetO-AOX1 inducible por Doxiciclina (M. Levesque, D. Krushinskie y K. Strauch, manuscrito en preparación). La secuencia codificadora extracelular (Gly1 a Gly125 de la proteína madura después de la eliminación de la secuencia señal) de MOG de rata se amplificó por PCR usando los cebadores siguientes: 5'
- 10 GGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGCATCATCATCATCATATGGGACAGTTCAGAGTGATAGGG 3' (SEQ ID NO: 368) y 5' TTCGCGCCGCTATTAGCCAGGGTTGATCCAGTAGAAGGG 3' (SEQ ID NO: 369).

# ES 2 434 470 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biogen IDEC MA, Inc.  
 SHA, Mi  
 5 PEPINSKY, R. Blake  
 SHAO, Zhaohui

<120> Anticuerpos SP35 y Usos de Éstos

10 <130> 2159.036PC02

<150> 60/697,336  
 <151> 2005-07-08

15 <150> 60/771,900  
 <151> 2006-02-10

<150> 60/814,522  
 <151> 2006-06-19

20 <160> 409

<170> PatentIn versión 3.3

25 <210> 1  
 <211> 1845  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 1  
 atgctggcgg ggggcgtgag gagcatgccc agccccctcc tggcctgctg gcagcccatc 60  
 ctctctgctgg tgctgggctc agtgctgtca ggctcggcca cgggctgccc gccccgctgc 120  
 35 gagtgtcccg cccaggaccg cgctgtgctg tgccaccgca agcgctttgt ggcagtcccc 180  
 gagggcatcc ccaccgagac gcgcctgctg gacctaggca agaaccgcat caaaacgctc 240  
 aaccaggacg agttcgccag cttcccgcac ctggaggagc tggagctcaa cgagaacatc 300  
 40 gtgagcgccg tggagcccgg cgccttcaac aacctcttca acctccggac gctgggtctc 360  
 cgcagcaacc gcctgaagct catcccgcta ggcgtcttca ctggcctcag caacctgacc 420  
 45 aagctggaca tcagcgagaa caagattggt atcctgctgg actacatggt tcaggacctg 480  
 tacaacctca agtcaactgga gggtggcgac aatgacctcg tctacatctc tcaccgcgcc 540  
 ttcagcggcc tcaacagcct ggagcagctg acgctggaga aatgcaacct gacctccatc 600  
 50 cccaccgagg cgctgtcca cctgcacggc ctcatcgtcc tgaggctccg gcacctcaac 660  
 atcaatgcca tccgggacta ctcttcaag aggctctacc gactcaaggt cttggagatc 720  
 55 tcccactggc cctacttga caccatgaca cccaactgcc tctacggcct caacctgacg 780



ES 2 434 470 T3

tcctgtcca tcacacactg caatctgacc gctgtgccct acctggccgt ccgccaccta 840  
 gtctatctcc gcttcctcaa cctctcctac aaccccatca gcaccattga gggctccatg 900  
 5 ttgcatgagc tgctccggct gcaggagatc cagctggtgg gcgggcagct ggccgtggtg 960  
 gagccctatg ccttcgcggg cctcaactac ctgctgctgc tcaatgtctc tggcaaccag 1020  
 ctgaccacac tggaggaatc agtcttccac tcggtgggca acctggagac actcatcctg 1080  
 10 gactccaacc cgctggcctg cgactgtcgg ctccctgtggg tgttccggcg ccgctggcgg 1140  
 ctcaacttca accggcagca gcccacgtgc gccacgcccg agtttgtcca gggcaaggag 1200  
 15 ttcaaggact tccctgatgt gctactgccc aactacttca cctgccgccg cgcccgcac 1260  
 cgggaccgca agggccagca ggtgtttgtg gacgagggcc acacggtgca gtttgtgtgc 1320  
 cgggccgatg gcgaccgcc gcccgccatc ctctggctct caccgccaaa gcacctggtc 1380  
 20 tcagccaaga gcaatgggcg gctcacagtc ttccctgatg gcacgctgga ggtgcgctac 1440  
 gcccaggtag aggacaacgg cacgtacctg tgcatcgccg ccaacgcggg cggcaacgac 1500  
 25 tccatgcccg cccacctgca tgtgctgagc tactcgcccg actggcccca tcagcccaac 1560  
 aagaccttcg ctttcatctc caaccagccg ggcgaggag aggccaacag caccgcgcc 1620  
 actgtgcctt tccccttcga catcaagacc ctcatcatcg ccaccacat gggcttcatc 1680  
 30 tctttctggt gcgtcgtcct cttctgctg gtgctgctgt ttctctggag ccggggcaag 1740  
 ggcaacacaa agcacaacat cgagatcgag tatgtgcccc gaaagtcgga cgcaggcatc 1800  
 35 agtccgcccg acgcgccccg caagttcaac atgaagatga tatga 1845

<210> 2  
 <211> 614  
 40 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 45 Met Leu Ala Gly Gly Val Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys  
 1 5 10 15  
 50 Trp Gln Pro Ile Leu Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser  
 20 25 30  
 55 Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala  
 35 40 45

ES 2 434 470 T3

Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro  
 50 55 60

5 Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu  
 65 70 75 80

10 Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu  
 85 90 95

15 Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu  
 100 105 110

Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile  
 115 120 125

20 Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile  
 130 135 140

25 Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu  
 145 150 155 160

30 Tyr Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile  
 165 170 175

35 Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu Asn Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu  
 180 185 190

Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ser Ile Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu  
 195 200 205

40 His Gly Leu Ile Val Leu Arg Leu Arg His Leu Asn Ile Asn Ala Ile  
 210 215 220

45 Arg Asp Tyr Ser Phe Lys Arg Leu Tyr Arg Leu Lys Val Leu Glu Ile  
 225 230 235 240

50 Ser His Trp Pro Tyr Leu Asp Thr Met Thr Pro Asn Cys Leu Tyr Gly  
 245 250 255

55 Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile Thr His Cys Asn Leu Thr Ala Val  
 260 265 270

ES 2 434 470 T3

Pro Tyr Leu Ala Val Arg His Leu Val Tyr Leu Arg Phe Leu Asn Leu  
 275 280 285

5 Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile Glu Gly Ser Met Leu His Glu Leu  
 290 295 300

10 Leu Arg Leu Gln Glu Ile Gln Leu Val Gly Gly Gln Leu Ala Val Val  
 305 310 315 320

15 Glu Pro Tyr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Tyr Leu Arg Val Leu Asn Val  
 325 330 335

20 Ser Gly Asn Gln Leu Thr Thr Leu Glu Glu Ser Val Phe His Ser Val  
 340 345 350

25 Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser Asn Pro Leu Ala Cys Asp  
 355 360 365

30 Cys Arg Leu Leu Trp Val Phe Arg Arg Arg Trp Arg Leu Asn Phe Asn  
 370 375 380

35 Arg Gln Gln Pro Thr Cys Ala Thr Pro Glu Phe Val Gln Gly Lys Glu  
 385 390 395 400

40 Phe Lys Asp Phe Pro Asp Val Leu Leu Pro Asn Tyr Phe Thr Cys Arg  
 405 410 415

45 Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys Ala Gln Gln Val Phe Val Asp Glu  
 420 425 430

50 Gly His Thr Val Gln Phe Val Cys Arg Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro  
 435 440 445

55 Ala Ile Leu Trp Leu Ser Pro Arg Lys His Leu Val Ser Ala Lys Ser  
 450 455 460

50 Asn Gly Arg Leu Thr Val Phe Pro Asp Gly Thr Leu Glu Val Arg Tyr  
 465 470 475 480

55 Ala Gln Val Gln Asp Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ile Ala Ala Asn Ala  
 485 490 495

ES 2 434 470 T3

Gly Gly Asn Asp Ser Met Pro Ala His Leu His Val Arg Ser Tyr Ser  
500 505 510

5 Pro Asp Trp Pro His Gln Pro Asn Lys Thr Phe Ala Phe Ile Ser Asn  
515 520 525

10 Gln Pro Gly Glu Gly Glu Ala Asn Ser Thr Arg Ala Thr Val Pro Phe  
530 535 540

15 Pro Phe Asp Ile Lys Thr Leu Ile Ile Ala Thr Thr Met Gly Phe Ile  
545 550 555 560

Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp  
565 570 575

20 Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val  
580 585 590

25 Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys  
595 600 605

30 Phe Asn Met Lys Met Ile  
610

<210> 3  
<211> 6  
35 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3

40 Met Gln Val Ser Lys Arg  
1 5

<210> 4  
45 <211> 29  
<212> ADN  
<213> Murinae gen. sp.

<400> 4  
50 gcgtctagaa ctggatggtg ggagatgga 29

<210> 5  
<211> 15  
55 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

# ES 2 434 470 T3

```

<220>
<223> VH-CDR1 (Li10)

5 <400> 5
acttacccta tggtt 15

<210> 6
10 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> VH-CDR1 (Li10)

<400> 6

20 Thr Tyr Pro Met Val
1 5

<210> 7
25 <211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> VH-CDR2 (Li10)

<400> 7
tggatcggtc cttctggtgg cgttactgct tatgctgact ccgtaaagg t 51

35 <210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> VH-CDR2 (Li10)

<400> 8

45 Trp Ile Gly Pro Ser Gly Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

50 Gly

<210> 9
55 <211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

```

# ES 2 434 470 T3

```

<220>
<223> VH-CDR3 (Li10)

5 <400> 9
ccctatagca gtggctgggtg ggacttcgat etc 33

<210> 10
10 <211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> VH-CDR3 (Li10)

<400> 10

20 Pro Tyr Ser Ser Gly Trp Trp Asp Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 11
<211> 15
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> VH-CDR1 (Li07)

<400> 11
atgtacttta tgggt 15

35 <210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> VH-CDR1 (Li07)

<400> 12

45 Met Tyr Phe Met Gly
1 5

<210> 13
50 <211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> VH-CDR2 (Li07)

```

# ES 2 434 470 T3

```

<400> 13
tctatctctc cttctggtgg ctttacttct tatgctgact ccgtaaagg t           51

5  <210> 14
   <211> 17
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> VH-CDR2 (Li07)

   <400> 14

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

20 Gly

   <210> 15
   <211> 21
25 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

   <220>
   <223> VH-CDR3 (Li07)
30 <400> 15
   gatcggcatg cttttgatat c           21

35 <210> 16
   <211> 7
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

40 <220>
   <223> VH-CDR3 (Li07)

   <400> 16

45 Asp Arg His Ala Phe Asp Ile
   1           5

50 <210> 17
   <211> 14
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

   <220>
55 <223> VH-CDR1 (Li05)

```

ES 2 434 470 T3

<400> 17  
 cttacgctat ggggt 14

5 <210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li05)  
 <400> 18

15 Ala Tyr Ala Met Gly  
 1 5

20 <210> 19  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li05)  
 <400> 19  
 tctatcgttt cttctgggtgg ctatactgat tatgctgact ccgttaaagg t 51

30 <210> 20  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li05)  
 <400> 20

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

45 Gly

50 <210> 21  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li05)



ES 2 434 470 T3

<400> 21  
gagggtgacc ataatgcttt tgatatac 27

5 <210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> VH-CDR3 (Li05)  
  
<400> 22

15 Glu Gly Asp His Asn Ala Phe Asp Ile  
1 5

20 <210> 23  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> VH-CDR1 (Li11)  
  
<400> 23  
tcttacgcta tgtat 15

30 <210> 24  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> VH-CDR1 (Li11)  
  
<400> 24

40 Ser Tyr Ala Met Tyr  
1 5

45 <210> 25  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> VH-CDR2 (Li11)  
  
<400> 25  
tctatctcta cttctgggtgg ctatactggt tatgctgact cegttaaagg t 51

55

ES 2 434 470 T3

<210> 26  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li11)  
 <400> 26  
 10 Ser Ile Ser Thr Ser Gly Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 15 Gly  
 <210> 27  
 20 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> VH-CDR3 (Li11)  
 <400> 27  
 gataccagcg ataatgacta ctactacatg gacgtc 36  
 30  
 <210> 28  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li11)  
 <400> 28  
 40 Asp Thr Ser Asp Asn Asp Tyr Tyr Tyr Met Asp Val  
 1 5 10  
 45 <210> 29  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li01)  
 <400> 29  
 aagtaccaga tgact 15  
 55

ES 2 434 470 T3

<210> 30  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li01)  
  
 <400> 30  
 10 Lys Tyr Gln Met Thr  
 1 5  
  
 15 <210> 31  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li01)  
  
 <400> 31  
 25 tctatctatc cttctgggtgg caatactggt tatgctgact cegttaaagg t 51  
  
 <210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li01)  
  
 35 <400> 32  
  
 Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 40 Gly  
  
 45 <210> 33  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li01)  
  
 <400> 33  
 55 gggactacag aggcagtctt tgactac 27

ES 2 434 470 T3

<210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li01)  
 <400> 34  
 10  
 Gly Thr Thr Glu Ala Val Phe Asp Tyr  
 1 5  
 15 <210> 35  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li12)  
 <400> 35  
 cagtacaata tgttt 15  
 25  
 <210> 36  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li12)  
 35 <400> 36  
 Gln Tyr Asn Met Phe  
 1 5  
 40  
 <210> 37  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li12)  
 <400> 37  
 50 cgtatctctt cttctggtgg catgactatg tatgctgact ccgttaaagg t 51  
 <210> 38  
 <211> 17  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 434 470 T3

<220>  
 <223> VH-CDR2 (Li12)

5 <400> 38

Arg Ile Ser Ser Ser Gly Gly Met Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

10 Gly

15 <210> 39  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li12)

<400> 39

25 gaagcgttac ggccttattg tagtggtggt agctgctact cgcactacta ctactacggt 60  
 atggacgtc 69

30 <210> 40  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li12)

<400> 40

40 Glu Ala Leu Arg Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Asp Tyr  
 1 5 10 15

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 20

45

50 <210> 41  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VH-CDR1 (Li06)

55 <400> 41  
 gagtacccta tggat 15

ES 2 434 470 T3

<210> 42  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li06)  
 10  
 <400> 42  
  
 Glu Tyr Pro Met Asp  
 1 5  
 15  
  
 <210> 43  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li06)  
 25 <400> 43  
 tctatctatt cttctggtgg ctctactggt tatgctgact ccattaaagg t 51  
  
 <210> 44  
 30 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 35 <223> VH-CDR2 (Li06)  
  
 <400> 44  
  
 Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Val Tyr Ala Asp Ser Ile Lys  
 40 1 5 10 15  
  
 Gly  
 45  
  
 <210> 45  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li06)  
 55 <400> 45  
 gagggtgact ctgatgcttt tgatatc 27

ES 2 434 470 T3

5 <210> 46  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li06)  
 10 <400> 46  
  
 Glu Gly Asp Ser Asp Ala Phe Asp Ile  
 1 5  
 15  
  
 <210> 47  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li08)  
 25 <400> 47  
 cattacgaga tggtt 15  
  
 <210> 48  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li08)  
 35 <400> 48  
  
 His Tyr Glu Met Val  
 40 1 5  
  
 <210> 49  
 <211> 51  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li08)  
 50 <400> 49  
 tctatccggtt cttctgggtgg cgctactaag tatgctgact ccgtaaagg t 51  
  
 55 <210> 50  
 <211> 17

ES 2 434 470 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> VH-CDR2 (Li08)

<400> 50

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

Gly

15

<210> 51  
<211> 27  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> VH-C DR3 (Li08)

25 <400> 51  
gagtcgccag acgactactt tgactac 27

<210> 52  
30 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> VH-CDR3 (Li08)

<400> 52

40 Glu Ser Pro Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 53  
<211> 15  
45 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> VH-CDR1 (Li03)

<400> 53  
cagtacccta tggag 15

55 <210> 54  
<211> 5



# ES 2 434 470 T3

```

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> VH-CDR1 (Li03)

<400> 54

Gln Tyr Pro Met Glu
10 1 5

<210> 55
<211> 51
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH-CDR2 (Li03)
20

<400> 55
ggtatctatc cttctggtgg ctctactggt tatgctgact ccgtaaagg t 51

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> VH-CDR2 (Li03)

<400> 56

35 Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

40 Gly

<210> 57
<211> 30
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH-CDR3 (Li03)
50

<400> 57
gcggggcagt ggctggggga ctttgactac 30

55 <210> 58
<211> 10

```

ES 2 434 470 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> VH-CDR3 (Li03)  
  
 <400> 58  
  
 Ala Gly Gln Trp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr  
 10 1 5 10  
  
 <210> 59  
 <211> 15  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li09)  
 20  
 <400> 59  
 atgtactcta tggtt 15  
  
 25 <210> 60  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li09)  
  
 <400> 60  
  
 35 Met Tyr Ser Met Val  
 1 5  
  
 40 <210> 61  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 45 <223> VH-CDR2 (Li09)  
  
 <400> 61  
 tatatctctc cttctgggtgg caagactatg tatgctgact cegttaaagg t 51  
  
 50  
 <210> 62  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>

ES 2 434 470 T3

<223> VH-CDR2 (Li09)  
 <400> 62  
 5 Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Lys Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 10  
 <210> 63  
 <211> 69  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li09)  
 20  
 <400> 63  
 gattcgagac gccggtatta cgatTTTTGG agtgggtatc acaactacta ctactactac 60  
 atggacgtc 69  
 25  
 <210> 64  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li09)  
 35 <400> 64  
 Asp Ser Arg Arg Arg Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr His Asn Tyr  
 1 5 10 15  
 40 Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val  
 20  
 45 <210> 65  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li04)  
 <400> 65  
 cgttacaata tgggt 15  
 55

# ES 2 434 470 T3

```

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> VH-CDR1 (Li04)

<400> 66
10
Arg Tyr Asn Met Gly
1 5

15 <210> 67
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> VH-CDR2 (Li04)

<400> 67
25 gttatctatc cttctgggtgg cggctactcat tatgctgact cegttaaagg t 51

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH-CDR2 (Li04)

35 <400> 68

Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Gly Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
40
Gly

45 <210> 69
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> VH-CDR3 (Li04)

<400> 69
55 tctatagcag atgatgcttt tgata 25

```

ES 2 434 470 T3

<210> 70  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li04)  
 <400> 70  
 10  
 Ser Ile Ala Asp Asp Ala Phe Asp Ile  
 1 5  
 15 <210> 71  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li02)  
 <400> 71  
 acttacgaga tgatt 15  
 25  
 <210> 72  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li02)  
 35 <400> 72  
 Thr Tyr Glu Met Ile  
 1 5  
 40  
 <210> 73  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li73)  
 <400> 73  
 50 tctatcggtc cttctggtgg ccttacttgg tatgctgact ccgttaa 48  
 <210> 74  
 <211> 17  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 434 470 T3

<220>  
 <223> VH-CDR2 (Li02)

5 <400> 74

Ser Ile Gly Pro Ser Gly Gly Leu Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

10 Gly

15 <210> 75  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li02)

<400> 75  
 atgtattact gtgtacggat tgatgatagt agtgggtggg cttttgatat c 51

25

<210> 76  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> VH-CDR3 (Li02)

35 <400> 76

Met Tyr Tyr Cys Val Arg Ile Asp Asp Ser Ser Gly Trp Ala Phe Asp  
 1 5 10 15

40 Ile

45 <210> 77  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

50 <400> 77

Asn Tyr Gly Met Asn  
 1 5

55 <210> 78

ES 2 434 470 T3

<211> 17  
<212> PRT  
<213> Murinae gen. sp.

5 <400> 78

Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe Gln  
1 5 10 15

10  
Gly

15 <210> 79  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Murinae gen. sp.

20 <400> 79

Glu Gly Val His Phe Asp Tyr  
1 5

25 <210> 80  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Murinae gen. sp.

30 <400> 80

Phe Ser Asp Ala Trp Leu Asp  
1 5

35 <210> 81  
<211> 19  
<212> PRT  
40 <213> Murinae gen. sp.

<400> 81

45 Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Asn Tyr Ala Glu Ser  
1 5 10 15

Val Lys Gly

50 <210> 82  
<211> 4  
<212> PRT  
55 <213> Murinae gen. sp.

ES 2 434 470 T3

<400> 82  
Ser Phe Ala Tyr  
1  
5

<210> 83  
<211> 5  
<212> PRT  
10 <213> Murinae gen. sp.

<400> 83  
Ser Ser Trp Thr Gln  
1 5  
15

<210> 84  
<211> 17  
20 <212> PRT  
<213> Murinae gen. sp.

<400> 84  
25 Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

30 Gly

<210> 85  
<211> 8  
35 <212> PRT  
<213> Murinae gen. sp.

<400> 85  
40 His Asn Ser Tyr Gly Met Asp Tyr  
1 5

<210> 86  
45 <211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> VH-CDR1 (Li10)

<400> 86  
cgggcgagtc agggatttgg caactgggta gcc 33

55 <210> 87



ES 2 434 470 T3

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li10)

<400> 87

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

<210> 88  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li10)

<400> 88  
 gctgcatcca gtttggaaag t 21

25 <210> 89  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li10)

<400> 89

35 Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
 1 5

40 <210> 90  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li10)

<400> 90  
 caacaggctc agactttccc gctcacc 27

50 <210> 91  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 434 470 T3

<220>  
 <223> VL-CDR3 (Li10)  
 <400> 91  
 5 Gln Gln Ala Gln Thr Phe Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 92  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li07)  
 <400> 92  
 tctggagatc agttgggtga caaacatgtg gct 33  
 20  
 <210> 93  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li07)  
 30 <400> 93  
 Ser Gly Asp Gln Leu Gly Asp Lys His Val Ala  
 1 5 10  
 35 <210> 94  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li07)  
 <400> 94  
 45 ctagacatta agaggcccg a 21  
 <210> 95  
 <211> 7  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li07)  
 55 <400> 95

ES 2 434 470 T3

```

Leu Asp Ile Lys Arg Pro Ala
1           5

5
<210> 96
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> VL-CDR3 (Li07)

<400> 96
15 caggcgtggg acatcaagac ggtc                24

<210> 97
<211> 8
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL-CDR3 (Li07)
25
<400> 97

Gln Ala Trp Asp Ile Lys Thr Val
1           5
30

<210> 98
<211> 33
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL-CDR1 (Li05)
40 <400> 98
gggggagaca acattggaag taagagtgtc cac        33

<210> 99
45 <211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> VL-CDR1 (Li05)

<400> 99

55 Gly Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1           5           10

```

ES 2 434 470 T3

<210> 100  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li05)  
 10 <400> 100  
 gatgattatg accggcctc a 21  
  
 <210> 101  
 15 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> VL-CDR2 (Li05)  
  
 <400> 101  
 Asp Asp Tyr Asp Arg Pro Ser  
 25 1 5  
  
 <210> 102  
 <211> 33  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li05)  
 35 <400> 102  
 caggtgaggg acagccgtac tgaggaacgg gtg 33  
  
 <210> 103  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li05)  
  
 <400> 103  
 50 Gln Val Arg Asp Ser Arg Thr Glu Glu Arg Val  
 1 5 10  
  
 <210> 104  
 55 <211> 33  
 <212> ADN

ES 2 434 470 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li11)  
 5 <400> 104  
 cgggcgagtc aggagattgc caactactta gcc 33

10 <210> 105  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li11)  
 <400> 105

20 Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ala Asn Tyr Leu Ala  
 1 5 10

25 <210> 106  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li11)  
 <400> 106  
 gatacatata ctttgcagac t 21

35 <210> 107  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li11)  
 <400> 107

45 Asp Thr Tyr Thr Leu Gln Thr  
 1 5

50 <210> 108  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li11)

ES 2 434 470 T3

<400> 108  
 caacaggctg acattttccc gctctct 27

5

<210> 109  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> VL-CDR3 (Li11)

15

<400> 109  
 Gln Gln Ala Asp Ile Phe Pro Leu Ser  
 1 5

20

<210> 110  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> VL-CDR1 (Li01)

30

<400> 110  
 caggcgagtc aggacattag caactattta aat 33

35

<210> 111  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> VL-CDR1 (Li01)

40

<400> 111  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10

45

<210> 112  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> VL-CDR2 (Li01)

55

<400> 112  
 gatgcatcca atttggaaac a 21

ES 2 434 470 T3

<210> 113  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li01)  
 10 <400> 113  
  
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5  
 15  
 <210> 114  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li01)  
  
 <400> 114  
 25 caacaggctg acaggttccc tgcggtcact 30  
  
 <210> 115  
 <211> 10  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li01)  
 35  
 <400> 115  
  
 Gln Gln Ala Asp Arg Phe Pro Ala Val Thr  
 1 5 10  
 40  
 <210> 116  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li06)  
 50 <400> 116  
 cgggccagtc agagtattag tagctggttg gcc 33  
  
 <210> 117  
 55 <211> 11  
 <212> PRT

ES 2 434 470 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li06)  
 5 <400> 117  
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10  
 10  
 <210> 118  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li06)  
 20 <400> 118  
 gctgcatcca gtttacgaac t 21  
 <210> 119  
 25 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> VL-CDR2 (Li06)  
 <400> 119  
 Ala Ala Ser Ser Leu Arg Thr  
 35 1 5  
 <210> 120  
 <211> 27  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li06)  
 45 <400> 120  
 ctacaagatt acagttaccc tctcact 27  
 <210> 121  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li06)



ES 2 434 470 T3

<400> 121  
 Leu Gln Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr  
 5 1 5

<210> 122  
 <211> 33  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VL-CDR1 (Li08)  
 15  
 <400> 122  
 caggcgagtc aggacattag ttactattta aat 33

20 <210> 123  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li08)  
 <400> 123

30 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr Leu Asn  
 1 5 10

35 <210> 124  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li08)  
 <400> 124  
 gatgtatcca atttgcaaac a 21

45 <210> 125  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li08)  
 <400> 125

55 Asp Val Ser Asn Leu Gln Thr

# ES 2 434 470 T3

```

1           5

<210> 126
5 <211> 27
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
10 <223> VL-CDR3 (Li08)

  <400> 126
  caacagtctg ataatctccc tctcact                                27

15
  <210> 127
  <211> 9
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

20
  <220>
  <223> VL-CDR3 (Li08)

  <400> 127
25 Gln Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr
   1           5

30 <210> 128
  <211> 32
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

35 <220>
  <223> VL-CDR1 (Li03)

  <400> 128
40 gggcaagtca gagcattagc agctatttaa at                                32

  <210> 129
  <211> 11
  <212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> VL-CDR1 (Li03)

50 <400> 129

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

55 <210> 130

```

ES 2 434 470 T3

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li03)

<400> 130  
 gctgcatcca gtttgcaaag t 21

10

<210> 131  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li03)

20 <400> 131

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5

25

<210> 132  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li03)

<400> 132  
 35 caacagagtt acagtacccc gtggacg 27

<210> 133  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li03)

45 <400> 133

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
 1 5

50

<210> 134  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55

# ES 2 434 470 T3

```

<220>
<223> VL-CDR1 (Li09)

<400> 134
5  cgcgcaagtc agagcatcga cacctattta aat                                33

<210> 135
<211> 11
10 <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL-CDR1 (Li09)
15 <400> 135

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Thr Tyr Leu Asn
20 1          5          10

<210> 136
<211> 21
25 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL-CDR2 (Li09)
30 <400> 136
    gctgcatcca agttggaaga c                                21

<210> 137
35 <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> VL-CDR2 (Li09)

<400> 137

Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp
45 1          5

<210> 138
<211> 26
50 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL-CDR3 (Li09)
55 <400> 138

```

caacagagtt acagtccccc tctcac 26

5 <210> 139  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li09)  
 <400> 139

15 Gln Gln Ser Tyr Ser Pro Pro Leu Thr  
 1 5

20 <210> 140  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li02)  
 <400> 140  
 tctggagata aattggggga taaatttgct tcc 33

30 <210> 141  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li02)  
 <400> 141

40 Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala Ser  
 1 5 10

45 <210> 142  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li02)  
 <400> 142  
 caagatagga agcgtctctc a 21

55 <210> 143

ES 2 434 470 T3

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li02)

<400> 143

10 Gln Asp Arg Lys Arg Leu Ser  
 1 5

<210> 144  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li02)

<400> 144  
 caggcgtggg acaccaacac tgtggtc 27

20 <210> 145  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li02)

<400> 145

30 Gln Ala Trp Asp Thr Asn Thr Val Val  
 1 5

35 <210> 146  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

40 <400> 146

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
 1 5 10

45 <210> 147  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

50 <400> 147

55

ES 2 434 470 T3

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
 1 5  
 5  
 <210> 148  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.  
 10  
 <400> 148  
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr  
 1 5  
 15  
 <210> 149  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 20 <213> Murinae gen. sp.  
 <400> 149  
 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala  
 25 1 5 10  
 <210> 150  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.  
 <400> 150  
 35 Asn Ala Lys Thr Leu Pro Asp  
 1 5  
 40 <210> 151  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.  
 <400> 151  
 45 Gln His Phe Trp Ala Ile Pro Tyr Thr  
 1 5  
 50 <210> 152  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.  
 55 <400> 152

ES 2 434 470 T3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
 1 5 10 15

5 Thr

<210> 153  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<400> 153  
 15 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

<210> 154  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<400> 154  
 25 Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Phe Thr  
 1 5 10

<210> 155  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<400> 155  
 35 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu  
 1 5 10 15

40 Thr

<210> 156  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<400> 156  
 50 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

55



ES 2 434 470 T3

<210> 157  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.  
 5  
 <400> 157  
  
 Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Phe Thr  
 1 5 10  
 10  
  
 <210> 158  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH (Li02)  
 20 <400> 158  
  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 25  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 30  
 Glu Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 35  
 Ser Ser Ile Gly Pro Ser Gly Gly Leu Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 40  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 45  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 50  
 Val Arg Ile Asp Asp Ser Ser Gly Trp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 55  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
  
 Phe Pro Leu Ala Pro  
 130

ES 2 434 470 T3

<210> 159  
 <211> 145  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH (Li09)  
 10 <400> 159  
  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr  
 20 25 30  
 20 Ser Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 25 Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Lys Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Phe Tyr  
 65 70 75 80  
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 40 Ala Arg Asp Ser Arg Arg Arg Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr His  
 100 105 110  
 40 Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val  
 115 120 125  
 45 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 130 135 140  
  
 Pro  
 145  
 50  
 <210> 160  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial

ES 2 434 470 T3

<220>

<223> VH (Li06)

<400> 160

5

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr  
20 25 30

15

Pro Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

20

Ser Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Val Tyr Ala Asp Ser Ile  
50 55 60

25

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

30

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

35

Ala Arg Glu Gly Asp Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
115 120 125

40

Leu Ala Pro  
130

<210> 161

<211> 131

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH (Li05)

50

<400> 161

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

55

ES 2 434 470 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr  
 20 25 30

5 Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

10 Ser Ser Ile Val Ser Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

25 Ala Arg Glu Gly Asp His Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

30 Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

35 Leu Ala Pro  
 130

<210> 162  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> VH (Li04)  
 <400> 162

45 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

55 Asn Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

60 Ser Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Gly Thr His Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

ES 2 434 470 T3

5 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  
 10 Ala Ser Ser Ile Ala Asp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 15 Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 20 Leu Ala Pro  
 130  
 <210> 163  
 <211> 131  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VH (Li08)  
 30 <400> 163  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr  
 20 25 30  
 40 Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 45 Ser Ser Ile Arg Ser Ser Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 50 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  
 55

ES 2 434 470 T3

Ala Lys Glu Ser Pro Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

5 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

10 Leu Ala Pro  
 130

<210> 164  
 <211> 134  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VH (L111)  
 20 <400> 164

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

30 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

35 Ser Ser Ile Ser Thr Ser Gly Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Thr Ser Asp Asn Asp Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly  
 100 105 110

50 Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

55 Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 130

ES 2 434 470 T3

<210> 165  
 <211> 133  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH (Li10)  
 10  
 <400> 165  
  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
  
 20 Pro Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
  
 25 Ser Trp Ile Gly Pro Ser Ser Gly Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
  
 30 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  
 35  
 Ala Arg Pro Tyr Ser Ser Gly Trp Trp Asp Phe Asp Leu Trp Gly Arg  
 100 105 110  
  
 40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
  
 45 Phe Pro Leu Ala Pro  
 130  
  
 <210> 166  
 50 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 55 <223> VH (Li01)

# ES 2 434 470 T3

```

<400> 166

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
5

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
          20          25          30
10

Gln Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
15

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
20

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
25

Ala Ser Gly Thr Thr Glu Ala Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
30

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
          115          120          125
35

Leu Ala Pro
          130

<210> 167
40 <211> 129
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> VH (Li07)

<400> 167

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
50 1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr
          20          25          30
55

```



ES 2 434 470 T3

Phe Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

5 Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

20 Ala Arg Asp Arg His Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val  
 100 105 110

25 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 115 120 125

30 <210> 168  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> VH (Li03)  
 <400> 168

40 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Tyr  
 20 25 30

50 Pro Met Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

55 Ser Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

# ES 2 434 470 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
5

Ala Arg Ala Gly Gln Trp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
10

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125  
15

Pro Leu Ala Pro  
130  
20

<210> 169  
<211> 145  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
25

<220>  
<223> VH (Li12)  
<400> 169  
30

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
35

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Tyr  
20 25 30  
40

Asn Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
45

Ser Arg Ile Ser Ser Ser Gly Gly Met Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
50

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
55

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
60

Ala Arg Glu Ala Leu Arg Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser  
100 105 110  
55

ES 2 434 470 T3

Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 115 120 125

5 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 130 135 140

10 Pro  
 145

<210> 170  
 <211> 116  
 15 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

<400> 170

20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

25 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

30 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45

35 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe  
 50 55 60

40 Gln Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

45 Leu Gln Phe Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

50 Ala Arg Glu Gly Val His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

55 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 171  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

ES 2 434 470 T3

<400> 171

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

5

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala  
 20 25 30

10

Trp Leu Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

15

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Asn Tyr Ala Glu  
 50 55 60

20

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser  
 65 70 75 80

25

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95

30

Phe Cys Thr Pro Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 100 105 110

35

Val Ser Ser  
 115

<210> 172  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

40 <400> 172

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

45

Ser Val Lys Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser  
 20 25 30

50

Trp Thr Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

55

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe  
 50 55 60

# ES 2 434 470 T3

	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
5	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90						95	
10	Ala	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser
				100					105					110		
15	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115													
	<210>		173													
	<211>		399													
20	<212>		ADN													
	<213>		Secuencia artificial													
	<220>															
	<223>		VH (Li02)													
25	<400>		173													
	gaagttcaat	tgtttagagtc	tggtggcggc	cttgttcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt										60
30	tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	acttacgaga	tgatttgggt	tcgccaagct										120
	cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttcttct	atcggtcctt	ctggtggcct	tacttggtat										180
	gctgactccg	ttaaaggctc	cttcaactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac										240
35	ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	accgccatgt	attactgtgt	acggattgat										300
	gatagtagtg	gttgggcttt	tgatatctgg	ggccaagga	ccacggtcac	cgtctcaagc										360
40	gcctccacca	agggcccatc	ggtcttccc	ctagcaccc												399
	<210>		174													
	<211>		435													
	<212>		ADN													
45	<213>		Secuencia artificial													
	<220>															
	<223>		VH (Li09)													
50	<400>		174													
	gaagttcaat	tgtttagagtc	tggtggcggc	cttgttcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt										60
	tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	atgtactcta	tggttgggt	tcgccaagct										120
55	cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttcttat	atctctcctt	ctggtggcaa	gactatgtat										180

## ES 2 434 470 T3

	gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactttctac	240
	ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagattcg	300
5	agacgccggt attacgattt ttggagtggg tatcacaact actactacta ctacatggac	360
	gtctggggca aaggaccac ggtcaccgct tcaagcgctt ccaccaaggg cccatcggtc	420
10	ttcccgtag cacc	435
	<210> 175	
	<211> 393	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> VH (Li06)	
20	<400> 175	
	gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt	60
	tcttgcgctg cttccggatt cactttctct gactacccta tggattgggt tcgccaagct	120
25	cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctattctt ctggtggctc tactgtttat	180
	gctgactcca ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
30	ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cagagagggg	300
	gactctgatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcgctcc	360
	accaagggcc catcggctct cccgctagca ccc	393
35	<210> 176	
	<211> 393	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> VH (Li05)	
	<400> 176	
45	gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt	60
	tcttgcgctg cttccggatt cactttctct gcttacgcta tgggttgggt tcgccaagct	120
50	cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atcgtttctt ctggtggcta tactgattat	180
	gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
	ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cagagagggg	300
55	gaccataatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcgctcc	360

# ES 2 434 470 T3

```

accaagggcc catcgggttt cccgctagca ccc                                     393

<210> 177
5 <211> 393
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> VH (Li04)

<400> 177
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctgggtggttc tttacgtctt      60
15 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cgttacaata tgggttgggt tcgccaagct      120
   cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctatcctt ctgggtggcgg tactcattat      180
   gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
20 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagttctata      300
   gcagatgatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcgcctcc      360
25 accaagggcc catcgggttt cccgctagca ccc                                     393

<210> 178
30 <211> 393
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> VH (Li08)

<400> 178
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctgggtggttc tttacgtctt      60
40 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cattacgaga tgggttgggt tcgccaagct      120
   cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atccgttctt ctgggtggcgc tactaagtat      180
   gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
45 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagagtcg      300
   ccagacgact actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc aagcgcctcc      360
50 accaagggcc catcgggttt cccgctagca ccc                                     393

<210> 179
55 <211> 402
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

```

ES 2 434 470 T3

<220>  
 <223> VH (Li11)

<400> 179  
 5 gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tcttacgcta tgtattgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atctctactt ctggtggcta tactggttat 180  
 10 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatacc 300  
 15 agcgataatg actactacta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt caccgtctca 360  
 agcgctcca ccaagggcc atcggctctc ccgctagcac cc 402

<210> 180  
 <211> 399  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VH (Li10)

<400> 180  
 30 gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct acttacccta tggtttgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttgg atcggctcct ctggtggcgt tactgcttat 180  
 35 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaccctat 300  
 agcagtggtt ggtgggactt cgatctctgg ggccgtggca ccctggtcac cgtctcaagc 360  
 40 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcaccc 399

<210> 181  
 <211> 393  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VH (Li01)

<400> 181  
 55 gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtaccaga tgacttgggt tcgccaagct 120



## ES 2 434 470 T3

cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctatcctt ctggtggcaa tactgtttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 5 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagtgggact 300  
 acagaggcag tctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc aagcgctcc 360  
 accaagggcc catcggctct cccgctagca ccc 393  
 10  
 <210> 182  
 <211> 387  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VH (Li07)  
 20 <400> 182  
 gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtggctt tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct atgtacttta tgggttgggt tcgccaagct 120  
 25 cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctctcctt ctggtggctt tacttcttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac actgcagtct actattgtgc gagagatcgg 300  
 30 catgcttttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcaagcgc ctccaccaag 360  
 ggcccatcgg tcttcccgt agcacc 387  
 35  
 <210> 183  
 <211> 396  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> VH (Li03)  
 <400> 183  
 45 gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtggctt tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacccta tggagtgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttctggc atctatcctt ctggtggctt tactgtttat 180  
 50 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcgggg 300  
 55 cagtggctgg gggactttga ctactggggc caggggaacc tggtcaccgt ctcaagcgc 360

# ES 2 434 470 T3

```

tccaccaagg gcccatcggg cttcccgccta gcaccc                                396

<210> 184
5 <211> 435
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> VH (Li12)

<400> 184
gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggg cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
15 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacaata tgttttgggt tcgccaagct     120
   cctggtaaag gtttgagtg ggtttctcgt atctcttctt ctggtggcat gactatgtat     180
   gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac     240
20 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagcg     300
   ttacggcctt attgtagtgg tggtagctgc tactccgact actactacta cggtatggac     360
25 gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcaagcgctt ccaccaaggg cccatcggtc     420
   ttcccgctag caccc                                                    435

30
<210> 185
<211> 357
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial
35
<220>
<223> VL (Li02)

<400> 185
40 ttctattctc acagtcaca gtacgaattg actcagccac cctcagtgtc cgtgtcccca      60
   ggacagacag ccagcatcac ctgctctgga gataaattgg gggataaatt tgcttctctg     120
   tatcagcaga aggcaggcca gtcccctgtg ctggctatct ttcaagatag gaagcgtctc     180
45 tcagggatcc ctgagcgatt ctctggctcc aactctggga acacagccac tctgaccatc     240
   agcgggaccc aggctatgga tgaggctgac tattactgtc aggcgtggga caccaaacact     300
50 gtggtcttcg gcggagggac caagctgacc gtccataggtc agcccaaggc tgcccc      357

<210> 186
55 <211> 360
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

```

ES 2 434 470 T3

<220>  
 <223> VL (Li09)

5 <400> 186  
 ttctattctc acagtgcaca agacatccag atgaccagtc ctccatcctc cctgtctgca 60  
 tttgtgggag acagagtcgc catcacttgc cgcgcaagtc agagcatcga cacctattta 120  
 10 aattggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaaactcc tgatctatgc tgcattcaag 180  
 ttggaagacg ggggtcccatc aagattcagt ggcagtggaa ctgggacaga tttcactctc 240  
 accatcagaa gtctgcaacc tgaagatctt ggaacttact actgtcaaca gagttacagt 300  
 15 cccctctca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacgaactgt ggctgcacca 360

<210> 187  
 20 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <223> VL (Li06)

<400> 187  
 ttctattctc acagtgcaca agacatccag atgaccagtc ctccctccac cctgtctgca 60  
 30 tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggccagtc agagtattag tagctggttg 120  
 gcctggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaacctcc tgatctatgc tgcattcagt 180  
 ttacgaactg ggggtcccatc aagattcagg ggcagtggat ctggcacaga tttcactctc 240  
 35 accatcagca gcctgcagcc tgaagatctt gcaacgtatt actgtctaca agattacagt 300  
 taccctctca cttttggcca ggggaccaag ctggagatca aacgaactgt ggctgcacca 360

40 <210> 188  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> VL (Li05)

<400> 188  
 50 ttctattctc acagtgcaca gagcgtcttg actcagccac cctcgggtgc agtggcccca 60  
 ggccagacgg ccaggatttc ctgtggggga gacaacattg gaagtaagag tgtccactgg 120  
 taccagcaga ggccaggcca ggcccctgtc ctggctgtgt atgatgatta tgaccggccc 180  
 55 tcagggatcc ctgagcgatt ctctggctcc aactctgggg acacggccat cctgaccatc 240

# ES 2 434 470 T3

```

accagggctcg aagtcgggga tgaggccgac ttttattgtc aggtgagga cagccgtact 300
gaggaacggg tgttcggcgg agggaccaag gtgaccgtct taggtcagcc caaggctgcc 360
5 ccc 363

<210> 189
10 <211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> VL (Li08)

<400> 189
ttctattctc acagtgcaca agacatccag atgaccagct ctccatcttc cctgtctgca 60
20 tctgtaggag acagagtcac catcacttgc caggcgagtc aggacattag ttactattta 120
aattggtatc agcagaagcc agggaaagcc cctaaggctc tgatctacga tgtatccaat 180
ttgcaaacag gggccccatc aaggttcagt ggaagtgcgt ctgcgacaga ttttactctc 240
25 accatcagca gcctgcagcc tgaagatatt gcgacatatt actgtcaaca gtctgataat 300
ctccctctca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatta aacgaactgt ggctgcacca 360
30

<210> 190
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35

<220>
<223> VL (Li11)

<400> 190
40 ttctattctc acagtgcaca agacatccag atgaccagct ctccatcttc tgtgtctgca 60
cctataggag acagagtcac catcacttgt cggcgagtc aggagattgc caactactta 120
gcctggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatga tacatacact 180
45 ttgcagactg acgtcccacc gaggttcagc ggcagtggtt cggggacaga tttcactctc 240
actatcagca gcctgcagcc tgaagatact gcaacttact tttgtcaaca ggctgacatt 300
50 ttcccgtctc ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacgaactgt ggctgcacca 360

<210> 191
<211> 366
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

```

# ES 2 434 470 T3

```

<220>
<223> VL (Li10)

5  <400> 191
   ttctattctc acagtgcaca agacatccag atgaccaggc ctccatcttc catgtctgct    60
   tctgtagggg acacagtcac catcacttgt cgggagagtc agggatttgg caactgggta    120
10  gcttggatc agcagaaacc agggaaagcc ccaactctcc tgatctatgc tgcattcagg    180
   ttggaaagtg ggggtcccatc aagggttcacc ggcagcggca gttcctctgg gatagatttc    240
   actctcacca tcagcgacct gcaccctgaa gatttggcaa cttactattg tcaacaggct    300
15  cagactttcc cgctcacctt cggcggaggg accaggggtg acctcaagcg aactgtggct    360
   gcacca                                           366

20
   <210> 192
   <211> 363
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

25
   <220>
   <223> VL (Li01)

   <400> 192
30  ttctattctc acagtgcaca agacatccag atgaccaggc ctccatcttc cctgtctgca    60
   tctgtaggag acagagtcac catcacttgc caggcagagtc aggacattag caactattta    120
   aattggatc agcagaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctacga tgcattcaat    180
35  ttggaaacag ggggtcccatc aagggttcagc ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc    240
   accatcagca gcttgcagcc tgaagatttt gcaacttact attgtcaaca ggctgacagg    300
40  ttccctgcgg tcaactttcgg cggagggacc aagggtggaga tcaaacgaac tgtggctgca    360
   cca                                           363

45
   <210> 193
   <211> 354
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

50
   <220>
   <223> VL (Li07)

   <400> 193
55  ttctattctc acagtgcaca gagcgaattg actcagccac cctcagtgtc cgtgtcccca    60
   ggacagacag ccatcatcac ctgctctgga gatcagttgg gtgacaaaca tgtggcttgg    120

```

# ES 2 434 470 T3

```

tatcaacaga agccaggcca gtcccctgtg ctggatcatct atctagacat taagaggccc      180
gcagggattt ctgagcgatt ctctggctcc aactctggaa atacagccac tctgaccatc      240
5  agagggaccc aggctatgga tgaagctgac tattactgtc aggcgtggga catcaagacg      300
gtcttcggcg gggggaccaa gctgaccgtc ctgagtcagc ccaaggctgc cccc            354

10  <210> 194
    <211> 360
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

15  <220>
    <223> VL (Li03)

    <400> 194
20  ttctattctc acagtgcaca agacatccag atgaccctgt ctccatcctc cctgtctgca      60
    tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggcaagtc agagcattag cagctattta      120
    aattggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatgc tgcattccagt      180
25  ttgcaaagtg ggggtcccatc aagggttcagt ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc      240
    accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt gcaacttact actgtcaaca gagttacagt      300
30  accccgtgga cgttcggcca agggaccaag gtggaaatca aacgaactgt ggctgcacca      360

    <210> 195
    <211> 10
35  <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> VH-CDR1 (L1a.01)
40  <400> 195

    Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly
    1           5           10

45  <210> 196
    <211> 17
    <212> PRT
50  <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> VH-CDR2 (L1a.01)

55  <400> 196

```

# ES 2 434 470 T3

```

Ile Ile Asp Pro Asp Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1           5           10           15

5 Gly

<210> 197
10 <211> 10
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> VH-CDR3 (L1a.01)

<400> 197

Ala Glu Phe Tyr Trp Gly Ala Tyr Asp Gly
20 1           5           10

<210> 198
25 <211> 10
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> VH-CDR1 (L1a.02)

<400> 198

Gly Gly Ser Ile Arg Gly Asn Tyr Trp Ser
35 1           5           10

<210> 199
40 <211> 14
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> VH-CDR2 (L1a.02)

<400> 199

Ser Ile Asn Tyr Ser Gly Phe Thr Asn Pro Ser Leu Lys Gly
50 1           5           10

<210> 200
55 <211> 8
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>

```

ES 2 434 470 T3

<223> VH-CDR3 (L1a.02)

<400> 200

5 Val Arg His Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 201  
10 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
15 <223> VH-CDR1 (L1a.03)

<400> 201

Gly Tyr Thr Phe Asn Gly Phe Asp Met His  
20 1 5 10

<210> 202  
25 <211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> VH-CDR2 (L1a.03)

<400> 202

Trp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
35 1 5 10 15

Gly

40 <210> 203  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> VH-CDR3 (L1a.03)

<400> 203

50 Asp Phe Tyr Met Asp Gly His Tyr Tyr Ile Phe Asp Val  
1 5 10

55 <210> 204  
<211> 10



ES 2 434 470 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> VH-CDR1 (L1a.04)  
  
 <400> 204  
  
 Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr Tyr Ile His  
 10 1 5 10  
  
 <210> 205  
 <211> 17  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (L1a.04)  
 20 <400> 205  
  
 Ile Ile Asp Pro Gly Asp Ser Phe Thr Ser Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 25 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 30  
 <210> 206  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (L1a.04)  
  
 <400> 206  
 40  
 Asp Leu Ala Trp Ile Asp Tyr Gly Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
  
 45 <210> 207  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> VH-CDR1 (L1a.05)  
  
 <400> 207  
  
 55 Gly Phe Thr Phe Thr Ser His Thr Val Ser  
 1 5 10

ES 2 434 470 T3

5 <210> 208  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (L1a.05)  
 10  
 <400> 208  
  
 Ser Ile Thr Gly Asn Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 15  
 Gly  
  
 20  
 <210> 209  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (L1a.05)  
  
 <400> 209  
 30  
 Phe Tyr Gly Asp Phe Asp Ser  
 1 5  
  
 35 <210> 210  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> VH-CDR1 (L1a.06)  
  
 <400> 210  
  
 45 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn Trp Met Ser  
 1 5 10  
  
 50 <210> 211  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 55 <223> VH-CDR2 (L1a.06)

ES 2 434 470 T3

<400> 211  
Thr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15  
5  
Gly  
10  
<210> 212  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
15  
<220>  
<223> VH-CDR3 (L1a.06)  
20  
<400> 212  
Asp Leu Pro Met Lys Gly Phe Ile Gln Gln Arg Tyr Gly Phe Asp Asp  
1 5 10 15  
25 Val  
30  
<210> 213  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
35  
<220>  
<223> VH-CDR1 (L1a.07)  
40  
<400> 213  
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile Ser  
1 5 10  
45  
<210> 214  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
50  
<220>  
<223> VH-CDR2 (L1a.07)  
55  
<400> 214  
Thr Ile Trp Gly Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

# ES 2 434 470 T3

Gly

```

5  <210> 215
   <211> 11
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> VH-CDR3 (L1a.07)

   <400> 215

15 Glu Tyr Trp Tyr Tyr Asp Gln Phe Thr Ala Val
   1           5           10

   <210> 216
   <211> 12
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

   <220>
25 <223> VH-CDR1 (L1a.08)

   <400> 216

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Ser
30 1           5           10

   <210> 217
   <211> 18
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

   <220>
   <223> VH-CDR2 (L1a.08)
40 <400> 217

Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val
45 1           5           10           15

Lys Ser

50 <210> 218
   <211> 10
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

55 <220>

```

# ES 2 434 470 T3

```

<223>  VH-CDR3 (L1a.08)

<400>  218

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

<210>  219
10 <211>  10
   <212>  PRT
   <213>  Secuencia artificial

<220>
15 <223>  VH-CDR1 (L1a.09)

<400>  219

20 Gly Tyr Ser Phe Thr Asn His Trp Ile Gly
   1                5                10

<210>  220
25 <211>  17
   <212>  PRT
   <213>  Secuencia artificial

<220>
30 <223>  VH-CDR2 (L1a.09)

<400>  220

35 Ile Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
   1                5                10                15

Gly

40 <210>  221
   <211>  11
   <212>  PRT
   <213>  Secuencia artificial

45 <220>
   <223>  VH-CDR3 (L1a.09)

<400>  221

50 Gly Phe Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Phe Asp Val
   1                5                10

55 <210>  222
   <211>  10

```

ES 2 434 470 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> VH-CDR1 (L1a.10)  
  
 <400> 222  
  
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Ala  
 10 1 5 10  
  
 <210> 223  
 <211> 17  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (L1a.10)  
 20 <400> 223  
  
 Met Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asn Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 25 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 30  
 <210> 224  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (L1a.10)  
  
 <400> 224  
 40  
 Thr Asn Tyr Leu Gly Phe Tyr Asp Ser  
 1 5  
  
 45 <210> 225  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> VH-CDR1 (L1a.11)  
  
 <400> 225  
  
 55 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Ile Ser  
 1 5 10

ES 2 434 470 T3

5 <210> 226  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (L1a.11)  
 10  
 <400> 226  
  
 Asn Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 15  
 Gly  
  
 20  
 <210> 227  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (L1a.11)  
  
 <400> 227  
 30  
 Gly Tyr Pro Thr Asp Asp Tyr Ser Phe Asp Ile  
 1 5 10  
  
 35 <210> 228  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> VH-CDR1 (L1a.12)  
  
 <400> 228  
  
 45 Gly Asp Ser Val Ser Asp Asn Ser Ala Ala Trp Gly  
 1 5 10  
  
 50 <210> 229  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 55 <223> VH-CDR2 (L1a.12)

ES 2 434 470 T3

<400> 229

Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val  
1 5 10 15

5

Lys Ser

10

<210> 230  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> VH-CDR3 (L1a.12)

20

<400> 230  
Gly Arg His Glu Tyr Gly Gly Leu Gly Tyr Ala Glu Ala Met Asp His  
1 5 10 15

25

<210> 231  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> VH-CDR1 (L1a.13)

<400> 231

35

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser  
1 5 10

40

<210> 232  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> VH-CDR2 (L1a.13)

<400> 232

50

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

Gly

55



ES 2 434 470 T3

<210> 233  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (L1a.13)  
 <400> 233  
 10  
 His Tyr Thr Tyr Met His Phe Glu Asp Tyr  
 1 5 10  
 15 <210> 234  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.01)  
 <400> 234  
 25 Ser Gly Asp Ser Leu Pro Ser Lys Phe Val His  
 1 5 10  
 30 <210> 235  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> VL-CDR2 (L1a.01)  
 <400> 235  
 Arg Asp Asn Asn Arg Pro Ser  
 40 1 5  
 <210> 236  
 <211> 8  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (L1a.01)  
 50 <400> 236  
 Ser Ser Tyr Asp Ala Leu Thr Asp  
 55 1 5

ES 2 434 470 T3

<210> 237  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.02)  
  
 <400> 237  
 10  
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Leu Gly  
 1 5 10  
  
 15 <210> 238  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> VL-CDR2 (L1a.02)  
  
 <400> 238  
  
 25 Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 1 5  
  
 30 <210> 239  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 35 <223> VL-CDR3 (L1a.02)  
  
 <400> 239  
  
 Gln Gln Ala Ser Asp Ala Pro Glu  
 40 1 5  
  
 45 <210> 240  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.03)  
 50  
 <400> 240  
  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Phe Trp Leu Asn  
 1 5 10  
 55

ES 2 434 470 T3

<210> 241  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> VL-CDR2 (L1a.03)  
  
<400> 241  
10  
Ala Gly Ser Asn Leu Gln Ser  
1 5  
  
15 <210> 242  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
20 <220>  
<223> VL-CDR3 (L1a.03)  
  
<400> 242  
  
25 Met Gln Asp Ser Asp Phe Pro Phe  
1 5  
  
30 <210> 243  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
35 <223> VL-CDR1 (L1a.04)  
  
<400> 243  
  
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val Ser  
40 1 5 10  
  
45 <210> 244  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
50 <223> VL-CDR2 (L1a.04)  
  
<400> 244  
  
Arg Asn Asn Asn Arg Pro Ser  
55 1 5

ES 2 434 470 T3

<210> 245  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (L1a.04)  
 <400> 245  
 10  
 Gln Thr Tyr Asp Asn Ser Thr Asp  
 1 5  
 15 <210> 246  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.05)  
 <400> 246  
 25 Ser Gly Asp Asn Ile Arg Ser Tyr Tyr Val His  
 1 5 10  
 30 <210> 247  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> VL-CDR2 (L1a.05)  
 <400> 247  
 Glu Asp Ser Asn Arg Pro Ser  
 40 1 5  
 <210> 248  
 <211> 10  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (L1a.05)  
 50 <400> 248  
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ala Ile Leu Leu His  
 55 1 5 10

ES 2 434 470 T3

<210> 249  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.06)  
 <400> 249  
 10  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Leu Arg Thr Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15  
 15 <210> 250  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VL-CDR2 (L1a.06)  
 <400> 250  
 25 Leu Val Ser Asn Arg Ala Ser  
 1 5  
 30 <210> 251  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> VL-CDR3 (L1a.06)  
 <400> 251  
 Gln Gln Tyr Tyr Gly Met Pro Leu  
 40 1 5  
 <210> 252  
 <211> 12  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.07)  
 50 <400> 252  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Gln Tyr Leu Ala  
 1 5 10  
 55

ES 2 434 470 T3

<210> 253  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> VL-CDR2 (L1a.07)  
  
<400> 253  
10  
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5  
  
15 <210> 254  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
20 <220>  
<223> VL-CDR3 (L1a.07)  
  
<400> 254  
25 Gln Gln Tyr Gly Ser Val Pro Arg  
1 5  
  
30 <210> 255  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
35 <223> VL-CDR1 (L1a.08)  
  
<400> 255  
40 Ser Gly Asp Ser Leu Gly Ser Tyr Tyr Val His  
1 5 10  
  
45 <210> 256  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
50 <223> VL-CDR2 (L1a.08)  
  
<400> 256  
55 Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser  
1 5

ES 2 434 470 T3

<210> 257  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (L1a.08)  
 <400> 257  
 10  
 Ser Ala Tyr Asp Tyr Ser Ala Arg Thr  
 1 5  
 15 <210> 258  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.09)  
 <400> 258  
 25 Ser Gly Asp Asn Leu Gly Ser Lys Tyr Val Ser  
 1 5 10  
 30 <210> 259  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> VL-CDR2 (L1a.09)  
 <400> 259  
 Asp Asp Asp Asp Arg Pro Ser  
 40 1 5  
 <210> 260  
 <211> 10  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (L1a.09)  
 50 <400> 260  
 Ser Ser Tyr Asp Phe Leu Asn Ile Gly Leu  
 1 5 10  
 55

ES 2 434 470 T3

<210> 261  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.10)  
 <400> 261  
 10  
 Ser Gly Asp Ser Leu Gly Lys Lys Ser Val His  
 1 5 10  
 15 <210> 262  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VL-CDR2 (L1a.10)  
 <400> 262  
 25 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser  
 1 5  
 30 <210> 263  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> VL-CDR3 (L1a.10)  
 <400> 263  
 Ser Ser Tyr Thr Asn Ser Val Asp  
 40 1 5  
 <210> 264  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.11)  
 50 <400> 264  
 Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Gly  
 1 5 10  
 55



ES 2 434 470 T3

<210> 265  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> VL-CDR2 (L1a.11)  
  
<400> 265  
10  
Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser  
1 5  
  
15 <210> 266  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
20 <220>  
<223> VL-CDR3 (L1a.11)  
  
<400> 266  
  
25 Gln Ser Tyr Asp Asp Thr Ser Ile  
1 5  
  
30 <210> 267  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
35 <223> VL-CDR1 (L1a.12)  
  
<400> 267  
  
Ser Gly Asp Ser Leu Gly Asn Lys Tyr Val His  
40 1 5 10  
  
45 <210> 268  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
50 <223> VL-CDR2 (L1a.12)  
  
<400> 268  
  
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
55 1 5

ES 2 434 470 T3

<210> 269  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (L1a.12)  
 <400> 269  
 10  
 Gln Thr Trp Asp Tyr Val Gly Tyr  
 1 5  
 15 <210> 270  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VL-CDR1 (L1a.13)  
 <400> 270  
 25 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser  
 1 5 10  
 30 <210> 271  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> VL-CDR2 (L1a.13)  
 <400> 271  
 Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser  
 40 1 5  
 <210> 272  
 <211> 10  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (L1a.13)  
 50 <400> 272  
 Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Arg Leu Lys Asn  
 1 5 10  
 55

ES 2 434 470 T3

<210> 273  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Li02 (VL)  
 <400> 273  
 10  
 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val  
 1 5 10 15  
 15 Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys  
 20 25 30  
 Leu Gly Asp Lys Phe Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ser  
 20 35 40 45  
 Pro Val Leu Val Ile Phe Gln Asp Arg Lys Arg Leu Ser Gly Ile Pro  
 25 50 55 60  
 Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75 80  
 30 Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp  
 85 90 95  
 35 Asp Thr Asn Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110  
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro  
 40 115  
 <210> 274  
 <211> 120  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Li09 (VL)  
 50 <400> 274  
 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 55 1 5 10 15

ES 2 434 470 T3

Ser Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala  
 20 25 30

5 Ser Gln Ser Ile Asp Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45

10 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp Gly  
 50 55 60

15 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 65 70 75 80

20 Thr Ile Arg Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 85 90 95

Gln Ser Tyr Ser Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 100 105 110

25 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 115 120

30 <210> 275  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Li06 (VL)  
 <400> 275

40 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

45 Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 20 25 30

50 Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45

Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Arg Thr Gly  
 50 55 60

55 Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 65 70 75 80

ES 2 434 470 T3

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu  
 85 90 95  
 5  
 Gln Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 100 105 110  
 10  
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 115 120  
 15 <210> 276  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Li05 (VL)  
 <400> 276  
 25 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val  
 1 5 10 15  
 30 Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn  
 20 25 30  
 35 Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala  
 35 40 45  
 40 Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Tyr Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro  
 50 55 60  
 45 Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Ile Leu Thr Ile  
 65 70 75 80  
 50 Thr Arg Val Glu Val Gly Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Gln Val Arg  
 85 90 95  
 55 Asp Ser Arg Thr Glu Glu Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr  
 100 105 110  
 Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro  
 115 120

ES 2 434 470 T3

<210> 277  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Li08 (VL)  
 <400> 277  
 10  
 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 1 5 10 15  
 15 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala  
 20 25 30  
 Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 20 35 40 45  
 Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Asp Val Ser Asn Leu Gln Thr Gly  
 25 50 55 60  
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu  
 65 70 75 80  
 30 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 85 90 95  
 35 Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 100 105 110  
 40 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 115 120  
 <210> 278  
 <211> 120  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Li11 (VL)  
 50 <400> 278  
 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 1 5 10 15  
 55

ES 2 434 470 T3

Ser Val Ser Ala Pro Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 20 25 30

5 Ser Gln Glu Ile Ala Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45

10 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Tyr Thr Leu Gln Thr Asp  
 50 55 60

15 Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 65 70 75 80

20 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gln  
 85 90 95

Gln Ala Asp Ile Phe Pro Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 100 105 110

25 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 115 120

30 <210> 279  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Li10 (VL)

<400> 279

40 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

Ser Met Ser Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 20 25 30

45 Ser Gln Gly Ile Gly Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45

50 Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly  
 50 55 60

55 Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ile Asp Phe  
 65 70 75 80

# ES 2 434 470 T3

Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu His Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 5

Cys Gln Gln Ala Gln Thr Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg  
 100 105 110

10 Val Asp Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 115 120

15 <210> 280  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Li01 (VL)  
 <400> 280

25 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

30 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala  
 20 25 30

35 Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly  
 50 55 60

40 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 65 70 75 80

45 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 85 90 95

50 Gln Ala Asp Arg Phe Pro Ala Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 100 105 110

55 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 115 120



ES 2 434 470 T3

<210> 281  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Li07 (VL)  
 <400> 281  
 10  
 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val  
 1 5 10 15  
 15 Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ile Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln  
 20 25 30  
 Leu Gly Asp Lys His Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 20 35 40 45  
 Pro Val Leu Val Ile Tyr Leu Asp Ile Lys Arg Pro Ala Gly Ile Ser  
 25 50 55 60  
 Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75 80  
 30 Arg Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp  
 85 90 95  
 35 Asp Ile Lys Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser  
 100 105 110  
 40 Gln Pro Lys Ala Ala Pro  
 115  
 <210> 282  
 <211> 120  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Li03 (VL)  
 50 <400> 282  
 Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 55 1 5 10 15

ES 2 434 470 T3

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 20 25 30

5 Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45

10 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly  
 50 55 60

15 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 65 70 75 80

20 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 85 90 95

Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 100 105 110

25 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 115 120

30 <210> 283  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.

35 <400> 283

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

40 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

45 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 35 40 45

50 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

55 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr



ES 2 434 470 T3

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 5  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 10 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 15 Ile Asn Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95  
 20 Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu  
 100 105 110  
 Ile Arg  
 25  
 <210> 286  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Murinae gen. sp.  
 30  
 <400> 286  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15  
 35  
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30  
 40  
 Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 45 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 50 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 55  
 Ile Asn Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95

# ES 2 434 470 T3

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu  
                   100                                  105                                  110

5 Ile Arg

10 <210> 287  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(5)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.

20 <400> 287  
 Ile Thr Xaa Xaa Xaa  
 1                                  5

25 <210> 288  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(5)  
 35 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.  
 <400> 288

40 Ala Cys Xaa Xaa Xaa  
 1                                  5

45 <210> 289  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(5)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.  
 <400> 289

55 Val Cys Xaa Xaa Xaa

# ES 2 434 470 T3

```

1           5

<210> 290
5 <211> 5
  <212> PRT
  <213> Homo sapiens

10 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (3)..(5)
   <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.

15 <400> 290

   Ser Pro Xaa Xaa Xaa
   1           5

20
   <210> 291
   <211> 5
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

25
   <400> 291

   Ser Pro Arg Lys His
   1           5

30

   <210> 292
   <211> 5
   <212> PRT
35 <213> Homo sapiens

   <400> 292

   Ser Pro Arg Lys Lys
40 1           5

   <210> 293
   <211> 5
45 <212> PRT
   <213> Homo sapiens

   <400> 293

50 Ser Pro Arg Lys Arg
   1           5

   <210> 294
55 <211> 5
   <212> PRT

```

ES 2 434 470 T3

<213> Homo sapiens  
<400> 294  
5 Ser Pro Lys Lys His  
1 5  
  
<210> 295  
10 <211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 295  
15 Ser Pro His Lys His  
1 5  
  
<210> 296  
20 <211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 296  
25 Ser Pro Arg Arg His  
1 5  
  
30 <210> 297  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
35 <400> 297  
  
Ser Pro Arg His His  
1 5  
40  
  
<210> 298  
<211> 5  
<212> PRT  
45 <213> Homo sapiens  
  
<400> 298  
  
Ser Pro Arg Arg Arg  
50 1 5  
  
<210> 299  
<211> 5  
55 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 434 470 T3

<400> 299  
 Ser Pro His His His  
 5 1 5

<210> 300  
 <211> 5  
 10 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 300  
 15 Ser Pro Lys Lys Lys  
 1 5

<210> 301  
 20 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 301  
 25 Leu Ser Pro Arg Lys His  
 1 5

<210> 302  
 30 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 302  
 35 Leu Ser Pro Arg Lys Lys  
 1 5

<210> 303  
 40 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 303  
 45 Leu Ser Pro Arg Lys Arg  
 1 5

<210> 304  
 50 <211> 6  
 <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens



ES 2 434 470 T3

<400> 304  
Leu Ser Pro Lys Lys His  
1 5  
5  
<210> 305  
<211> 6  
<212> PRT  
10 <213> Homo sapiens  
<400> 305  
Leu Ser Pro His Lys His  
15 1 5  
<210> 306  
<211> 6  
20 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 306  
25 Leu Ser Pro Arg Arg His  
1 5  
<210> 307  
30 <211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 307  
35 Leu Ser Pro Arg His His  
1 5  
40 <210> 308  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
45 <400> 308  
Leu Ser Pro Arg Arg Arg  
1 5  
50 <210> 309  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
55 <400> 309

ES 2 434 470 T3

Leu Ser Pro His His His  
 1 5  
 5  
 <210> 310  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 10  
 <400> 310  
 Leu Ser Pro Lys Lys Lys  
 1 5  
 15  
 <210> 311  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 311  
 Trp Leu Ser Pro Arg Lys His  
 25 1 5  
 <210> 312  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 312  
 35 Trp Leu Ser Pro Arg Lys Lys  
 1 5  
 <210> 313  
 <211> 7  
 40 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 313  
 45 Trp Leu Ser Pro Arg Lys Arg  
 1 5  
 <210> 314  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50 <400> 314  
 55

ES 2 434 470 T3

Trp Leu Ser Pro Lys Lys His  
 1 5

5 <210> 315  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 315

Trp Leu Ser Pro His Lys His  
 1 5

15 <210> 316  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 316

Trp Leu Ser Pro Arg Arg His  
 1 5

25 <210> 317  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 317

Trp Leu Ser Pro Arg His His  
 1 5

35 <210> 318  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 318

45 Trp Leu Ser Pro Arg Arg Arg  
 1 5

50 <210> 319  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 319

# ES 2 434 470 T3

```

Trp Leu Ser Pro His His His
1                5

5  <210> 320
   <211> 7
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

10 <400> 320

Trp Leu Ser Pro Lys Lys Lys
1                5

15
   <210> 321
   <211> 6
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

20
   <400> 321

Ile Thr Pro Lys Arg Arg
1                5

25
   <210> 322
   <211> 5
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

30
   <400> 322

Ala Cys His His Lys
1                5

35
   <210> 323
   <211> 5
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

40
   <400> 323

45 Val Cys His His Lys
   1                5

50
   <210> 324
   <211> 5
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

55
   <220>
   <221> MISC_FEATURE

```

<222> (1)..(2)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.  
  
 <400> 324  
 5  
 Xaa Xaa Arg Lys His  
 1 5  
  
 10 <210> 325  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(2)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.  
 20  
 <400> 325  
  
 Xaa Xaa Arg Arg Arg  
 1 5  
 25  
  
 <210> 326  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens  
  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 35 <222> (1)..(2)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.  
  
 <400> 326  
  
 40 Xaa Xaa Lys Lys Lys  
 1 5  
  
  
 <210> 327  
 45 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(2)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.  
  
 55 <400> 327

Xaa Xaa His His His  
1 5

5 <210> 328  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(2)  
<223> Xaa es cualquier aminoácido.

15 <400> 328

Xaa Xaa Arg Lys Lys  
1 5

20 <210> 329  
<211> 5  
<212> PRT  
25 <213> Homo sapiens

<220>  
30 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(2)  
<223> Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 329

35 Xaa Xaa Arg Lys Arg  
1 5

40 <210> 330  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(2)  
<223> Xaa es cualquier aminoácido.

50 <400> 330

Xaa Xaa Lys Lys His  
1 5

55 <210> 331

<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(2)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.  
 10  
 <400> 331  
 Xaa Xaa His Lys His  
 1 5  
 15  
 <210> 332  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 25 <222> (1)..(2)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.  
 <400> 332  
 30 Xaa Xaa Arg Arg His  
 1 5  
 <210> 333  
 35 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(2)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.  
 45 <400> 333  
 Xaa Xaa Arg His His  
 1 5  
 50  
 <210> 334  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.

15

<400> 334

Ile Thr Xaa Xaa Xaa  
 1 5

20

<210> 335  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.

30

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.

35

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.

40

<400> 335

Ala Cys Xaa Xaa Xaa  
 1 5

45

<210> 336  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

55



ES 2 434 470 T3

<222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.  
  
 <220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.  
  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.  
  
 <400> 336  
 15 Val Cys Xaa Xaa Xaa  
 1 5  
  
 <210> 337  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es lys, arg, his, glu, o asp.  
 40 <400> 337  
  
 Ser Pro Xaa Xaa Xaa  
 1 5  
 45 <210> 338  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 50 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 338  
  
 Ser Pro Arg Leu His  
 55 1 5

ES 2 434 470 T3

<210> 339  
<211> 9  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens  
  
<400> 339  
  
Arg Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys  
10 1 5  
  
<210> 340  
<211> 9  
15 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 340  
  
Lys Lys Val Lys Val Lys Glu Lys Arg  
20 1 5  
  
<210> 341  
25 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 341  
30 Arg Arg Leu Arg Leu Arg Asp Arg Lys  
1 5  
  
35 <210> 342  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
40 <400> 342  
  
Arg Arg Gly Arg Gly Arg Asp Arg Lys  
1 5  
  
45 <210> 343  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
50 <400> 343  
  
Arg Arg Ile Arg Ala Arg Asp Arg Lys  
55 1 5

## ES 2 434 470 T3

<210> 344  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador de RT-PCR  
  
 <400> 344  
 10 agagacatgc gattggtga 19  
  
 <210> 345  
 <211> 21  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de RT-PCR  
 20  
 <400> 345  
 agagatgtag acgaggtcat t 21  
  
 25 <210> 346  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> LV1-036 (oligo con sentido)  
  
 <400> 346  
 35 tgatcgatcat cctgctagac ttcaagagag tctagcagga tgacgatctt ttttc 55  
  
 <210> 347  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> LV1-036 (oligo antisentido)  
  
 45 <400> 347  
 tcgagaaaaa agatcgatcat cctgctagac tctcttgaag tctagcagga tgacgatca 59  
  
 <210> 348  
 50 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 55 <223> Oligonucleótido

# ES 2 434 470 T3

<400> 348  
 tgatcctcat ccttctatac ttcaagagag tgtagcagga tgacgatctt ttttctcga 59

5 <210> 349  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido

<400> 349  
 tcgagaaaaa agatcgtcat cctgctagac tctcttgaag tatagaagga tgacgatca 59

15

<210> 350  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de PCR

25 <400> 350  
 gaggatctcg acgcggccgc atggagacag acacactcct g 41

<210> 351  
 30 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> Cebador de PCR

<400> 351  
 ggggcggaat tggatcctca cagatcctct tctgagatga g 41

40

<210> 352  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 352  
 50 gaggatctcg acgcggccgc atggagacag acacactcct g 41

<210> 353  
 <211> 42  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 434 470 T3

```

<220>
<223> Cebador de PCR

5 <400> 353
gatacggatc ctcagccttt gccccggctc catagaaaca gc 42

<210> 354
10 <211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Cebador de PCR

<400> 354
cagcaggtcg acgcggccgc atgctggcgg ggggcgt 37

20
<210> 355
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 355
30 cagcaggtcg acctcgcccg gctggttggc caaccagccg ggcgaggtcg acctcgagg 59

<210> 356
<211> 39
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

40
<400> 356
ggggatatcc accatggatt ttcaggtgca gattttcag 39

45 <210> 357
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador de PCR

<220>
<221> misc_feature
55 <222> (17)..(17)
<223> R es A o G.

```

## ES 2 434 470 T3

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
5 <223> K es G o T.

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
10 <223> Y es C o T.

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
15 <223> Y es C o T.

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
20 <223> R es A o G.

<400> 357
ggggatatcc accatgragt cacakacyca ggtcttyrta
25
<210> 358
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30
<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 358
35 ggggatatcc accatgaagt tgcttgtag gctggtg
37

<210> 359
<211> 40
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR
45

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> K es G o T.
50

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> W es A o T.
55
<220>

```

# ES 2 434 470 T3

```

<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Y es C o T.

5 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (34)..(34)
  <223> Y es C o T.

10 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (37)..(37)
  <223> K es G o T.

15 <400> 359
  ggggatatcc accatgaggk ccccwgtca gytyctkgga
  40

  <210> 360
  <211> 39
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Cebador de PCR

  <220>
  <221> misc_feature
  <222> (18)..(18)
  <223> R es A o G.

  <220>
  <221> misc_feature
  <222> (28)..(28)
  <223> K es G o T.

  <220>
  <221> misc_feature
  <222> (31)..(31)
  <223> M es A o C.

  <400> 360
  ggggatatcc accatggrat gsagctgkgt matsctctt
  39

45
  <210> 361
  <211> 39
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

50
  <220>
  <223> Cebador de PCR

  <220>
  <221> misc_feature
  <222> (17)..(17)

```

ES 2 434 470 T3

<223> R es A o G.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (26)..(26)  
 <223> Y es C o T.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (33)..(33)  
 <223> K es G o T.  
 <400> 361  
 15 ggggatatcc accatgract tcgggytgag ctkgggtttt 39  
 <210> 362  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 25 <400> 362  
 ggggatatcc accatggctg tcttggggct gctcttct 38  
 <210> 363  
 30 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Cebador de PCR  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 40 <223> Y es C o T.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25)..(26)  
 45 <223> R es A o G.  
 <400> 363  
 aggtctagaa yctccacaca caggrccag tggatagac 39  
 50  
 <210> 364  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>



<223> Cebador FR1

<220>

5 <221> misc\_feature  
<222> (5)..(5)  
<223> S es C o G.

<220>

10 <221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> M es A o C.

<220>

15 <221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> R es A o G.

<220>

20 <221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> S es C o G.

<220>

25 <221> misc\_feature  
<222> (20)..(20)  
<223> W es A o T.

<400> 364

30 aggtsmarct gcagsagtcw gg 22

<210> 365  
<211> 34

35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Cebador FR4

<400> 365

tgaggagacg gtgaccgtgg tcccttggcc ccag 34

<210> 366  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Cebador de PCR

<220>

55 <221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)

<223> R es A o G.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (9)..(9)  
 <223> Y es C o T.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (12)..(12)  
 <223> Y es C o T.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (18)..(18)  
 <223> H es A, C, o T.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (21)..(21)  
 <223> N es A, G, C, o T.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (24)..(24)  
 <223> N es A, G, C, o T.  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (27)..(27)  
 <223> Y es C o T.  
 <400> 366  
 35 atggartgya aytggathct nccntty 27  
 <210> 367  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Y es C o T.  
 50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25)..(26)  
 <223> R es A o G.  
 55  
 <400> 367

# ES 2 434 470 T3

	aggtctagaa yctccacaca caggrrrccag tggatagac	39
5	<210> 368 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR	
15	<400> 368 ggggtatctc tcgagaaaag agagcatcat catcatcatc atatgggaca gttcagagtg	60
20	ataggg	66
25	<210> 369 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR	
35	<400> 369 ttcgcggccg ctattagcca gggttgatcc agtagaaggg	40
40	<210> 370 <211> 354 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Li13 (VH)	
50	<400> 370 gaagttcaat tgttagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt	60
55	tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cattacgaga tgtattgggt tcgccaagct	120
	cctggtaaag gtttgagtg ggtttctcgt atcgtttctt ctggtggctt tactaagtat	180
	gctgactccg ttaaaggctc cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
	ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacagagggc	300
	gataatgatg cttttgatat ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc aagc	354
55	<210> 371 <211> 324 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 434 470 T3

<220>

<223> Li13 (VL)

<400> 371

5 gacatccaga tgacccagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180  
 10 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240  
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatgta cacttttggc 300  
 15 caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 372

<211> 118

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Li13 (VH)

25 <400> 372

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

ES 2 434 470 T3

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

5 <210> 373  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Li13 (VL)  
  
<400> 373

15 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

25 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

30 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

35 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met  
85 90 95

40 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

45 <210> 374  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> LI32 (VH)

<400> 374  
gaagtcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggtc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct gcttacatga tgcagtgggt tcgccaagct 120  
55 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcaa tactaagtat 180

ES 2 434 470 T3

gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240

5 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggagat 300

tatggatact ggttcgaccc ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc aagc 354

<210> 375

10 <211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Li32 (VL)

<400> 375

gacatccaga tgaccagtc tccagactcc ctgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc 60

20 atcacttgcc aggcgagtca agacattagc tactatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggatggccc ctaaactcct catctacgat gccttcattt tggaaggagg ggccccatca 180

25 cggttcagtg ggagcggctc tgggacagat ttttctttca ccatcagcaa tctacagcct 240

gaggatattg caacttattt ctgtcaacag tctgatcaac tgcccgtgac cttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcag a 321

30

<210> 376

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Li32 (VH)

<400> 376

40 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr

20 25 30

50 Met Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

55 Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

ES 2 434 470 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 10 Ala Arg Gly Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 15 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 377  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Li32 (VL)  
 25 <400> 377  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr  
 20 25 30  
 35 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Met Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 40 Tyr Asp Ala Phe Ile Leu Glu Gly Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 45 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 50 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Gln Leu Pro Val  
 85 90 95  
 50 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg  
 100 105  
 55 <210> 378  
 <211> 357

ES 2 434 470 T3

```

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Li33 (VH)

<400> 378
gaagttcaat tgttagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt    60
10 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct atttacccta tgttttgggt tcgccaagct    120
   cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttgg atcggtcctt ctggtggcat tactaagtat    180
   gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
15 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccacat attactgtgc gagagagggg    300
   cataacgact ggtacttcga tctctggggc cgtggcacc tggtcaccgt ctcaagc      357

20
<210> 379
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25
<220>
<223> Li33 (VL)

<400> 379
30 gacatccaga tgaccagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc    60
   ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct    120
   ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc    180
35 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct    240
   gaggattttg cagtttatta ctgtcagcag tatgataagt ggccgctcac tttcggcgga    300
40 gggaccaagg tggagatcaa a                                          321

<210> 380
<211> 119
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Li33 (VH)
50
<400> 380

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
55 1          5          10          15

```



ES 2 434 470 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr  
 20 25 30

5 Pro Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

10 Ser Trp Ile Gly Pro Ser Gly Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly His Asn Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly  
 100 105 110

25 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

30 <210> 381  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Li33 (VL)  
 <400> 381

40 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

45 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

50 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

55 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

65 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80

# ES 2 434 470 T3

```
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Lys Trp Pro Leu
                    85                                90                      95
5

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                100                      105

10
<210> 382
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Li34 (VH)

<400> 382
20 gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggg cttgttcagc ctggtaggctc tttacgtctt      60
   tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aattacgaga tgtattgggt tcgccaagct      120
   cctggtaaag gtttggagtg ggtttctggg atctattctt ctggtaggcat tactgtttat      180
25 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
   ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc tagggcagcc      300
30 atcctcgact ggtacttcga tctctggggc cgtggcacc cggtcaccgt ctcaagc      357

<210> 383
<211> 321
35 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Li34 (VL)

40
<400> 383
   gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
   atcacttgcc atgcgagtcg ggacattagc aactatttaa gttggtatca gcagaaacca      120
45 ggtaaagccc ctaaactcct gatctacgat gctttcaatt tggagacagg agtcccatcg      180
   aggttcagtg gaagtggatc tggcacagat ttacattca ccatcagcag cctgcagcct      240
50 gaagattttg caacatatta ctgtcagcac tatgataatc tccattcac tttcggcct      300
   gggaccagag tggcgatcag a                                         321

55 <210> 384
   <211> 119
```

ES 2 434 470 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Li34 (VH)

<400> 384

10 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

15

Glu Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

20

Ser Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

25

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

30

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

35

Ala Arg Ala Ala Ile Leu Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

40

<210> 385  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Li 34 (VL)

<400> 385

50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

55

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

ES 2 434 470 T3

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
5

Tyr Asp Ala Phe Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
10

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
15

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Leu Pro Phe  
85 90 95  
20

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Val Ala Ile Arg  
100 105

<210> 386  
<211> 11  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> VL-CDR1 (Li13)  
30  
<400> 386

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10  
35

<210> 387  
<211> 7  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> VL-CDR2 (Li13)  
45 <400> 387

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5  
50

<210> 388  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
55  
<220>

ES 2 434 470 T3

<223> VL-CDR3 (Li13)  
<400> 388  
5 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met Tyr Thr  
1 5 10  
  
<210> 389  
10 <211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
15 <223> VH-CDR1 (Li13)  
<400> 389  
  
His Tyr Glu Met Tyr  
20 1 5  
  
<210> 390  
<211> 17  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> VH-CDR2 (Li13)  
30 <400> 390  
  
Arg Ile Val Ser Ser Gly Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
35 1 5 10 15  
  
Gly  
  
40  
<210> 391  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
45  
<220>  
<223> VH-CDR3 (Li13)  
<400> 391  
50  
Glu Gly Asp Asn Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5  
  
55 <210> 392  
<211> 11

ES 2 434 470 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> VL-CDR1 (Li32)  
  
 <400> 392  
  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr Leu Asn  
 10 1 5 10  
  
 <210> 393  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li32)  
 20 <400> 393  
  
 Asp Ala Phe Ile Leu Glu Gly  
 1 5  
 25  
  
 <210> 394  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li32)  
 35 <400> 394  
  
 Gln Gln Ser Asp Gln Leu Pro Val Thr  
 1 5  
 40  
 <210> 395  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li32)  
  
 <400> 395  
 50  
 Ala Tyr Met Met Gln  
 1 5  
  
 55 <210> 396  
 <211> 17

ES 2 434 470 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> VH-CDR2 (Li32)  
  
 <400> 396  
  
 Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 10 1 5 10 15  
  
 Gly  
 15  
  
 <210> 397  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR3 (Li32)  
 25 <400> 397  
  
 Gly Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Asp Pro  
 1 5  
 30  
 <210> 398  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> VL-CDR1 (Li33)  
  
 <400> 398  
 40  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10  
  
 45 <210> 399  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> VL-CDR2 (Li33)  
  
 <400> 399  
  
 55 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

ES 2 434 470 T3

<210> 400  
 <211> 9  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR3 (Li33)  
 10  
 <400> 400  
  
 Gln Gln Tyr Asp Lys Trp Pro Leu Thr  
 1 5  
 15  
  
 <210> 401  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH-CDR1 (Li33)  
 25 <400> 401  
  
 Ile Tyr Pro Met Phe  
 1 5  
 30  
 <210> 402  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> VH-CDR2 (Li33)  
  
 <400> 402  
 40  
 Trp Ile Gly Pro Ser Gly Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 45 Gly  
  
 <210> 403  
 50 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 55 <223> VH-CDR3 (Li33)



# ES 2 434 470 T3

```

<400> 403

Glu Gly His Asn Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1           5           10

5

<210> 404
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL-CDR1 (Li34)

15 <400> 404

His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ser
1           5           10

20

<210> 405
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25

<220>
<223> VL-CDR2 (Li34)

<400> 405
30

Asp Ala Phe Asn Leu Glu Thr
1           5

35

<210> 406
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> VL-CDR3 (Li34)

<400> 406

45

Gln His Tyr Asp Asn Leu Pro Phe Thr
1           5

50

<210> 407
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> VH-CDR1 (Li34)

```

ES 2 434 470 T3

<400> 407

Asn Tyr Glu Met Tyr  
1 5

5

<210> 408

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH-CDR2 (Li34)

15 <400> 408

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

20

Gly

25 <210> 409

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> VH-CDR3 (Li34)

<400> 409

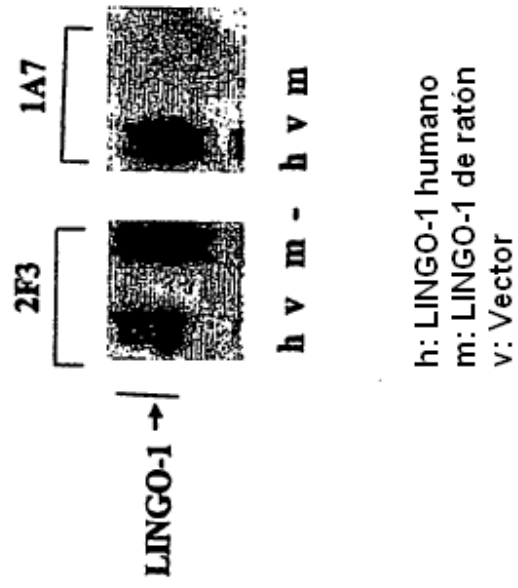
35 Ala Ala Ile Leu Asp Trp Tyr Phe Asp Leu  
1 5 10

40

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste que puede unirse específicamente a Sp35 y puede antagonizar Sp35, en el que el anticuerpo o fragmento de éste se selecciona del grupo que consiste en:
  - (i) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende una VH, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH son SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79 y una VL, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL son SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147 y SEQ ID NO: 148; y
  - (ii) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste que comprende una VH y una VL, en el que la VH comprende SEQ ID NO: 170 y la VL comprende SEQ ID NO: 283.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste es un antagonista de la inhibición del crecimiento de neuritas mediada por Sp35, un antagonista de la inhibición de la mielinización mediada por Sp35 o un antagonista de la inhibición de la diferenciación de oligodendrocitos mediada por Sp35.
3. Uso del anticuerpo Sp35 aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 ó 2 para la fabricación de un medicamento para tratar lesión cerebral traumática, lesión en la médula espinal o lesión en el nervio óptico.
4. El anticuerpo Sp35 aislado o fragmento de unión a antígeno de éste según la reivindicación 1 ó 2, para uso en el tratamiento de lesión cerebral traumática, lesión en la médula espinal o lesión en el nervio óptico.
5. Una composición que comprende uno o más polinucleótidos aislados que codifican el anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2.
6. Una célula huésped que comprende el uno o más polinucleótidos aislados de la reivindicación 5.
7. Uso del anticuerpo Sp35 aislado o fragmento de unión a antígeno de éste según la reivindicación 1 ó 2 para la fabricación de un medicamento para tratar esclerosis múltiple.
8. El anticuerpo Sp35 aislado o fragmento de unión a antígeno de éste según la reivindicación 1 ó 2, para uso en el tratamiento de esclerosis múltiple.
9. Un método *in vitro* para inhibir la transducción de la señal por NgR1, comprendiendo el método poner en contacto el NgR1 con una cantidad eficaz del anticuerpo Sp35 aislado o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1 ó 2.

FIG. 1



Datos FACS de células 293 transfectadas con LINGO-1 humano

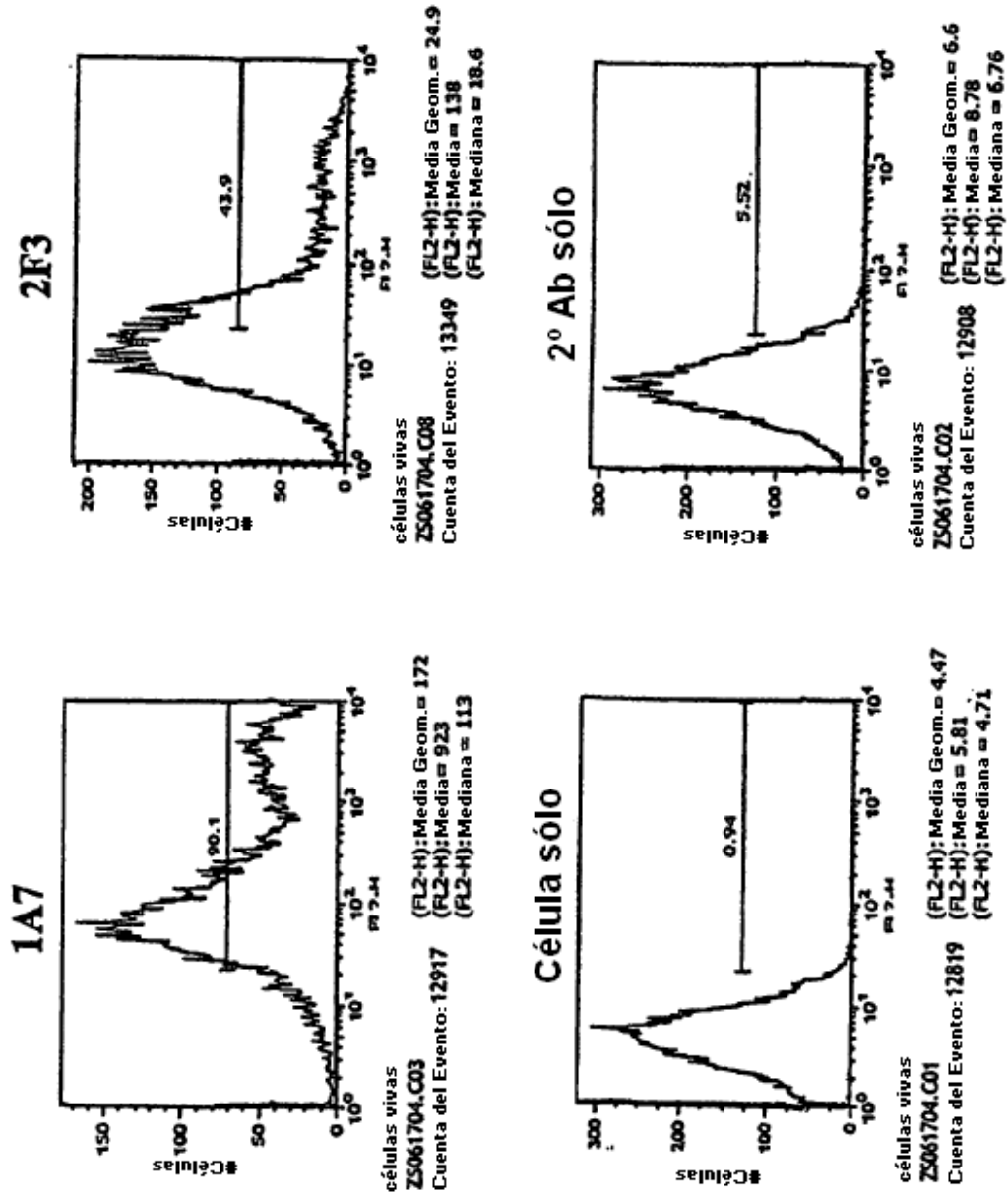


Fig 2

1A7 y 2F3 Estimulan el Crecimiento de Neuritas de CGN y DRG

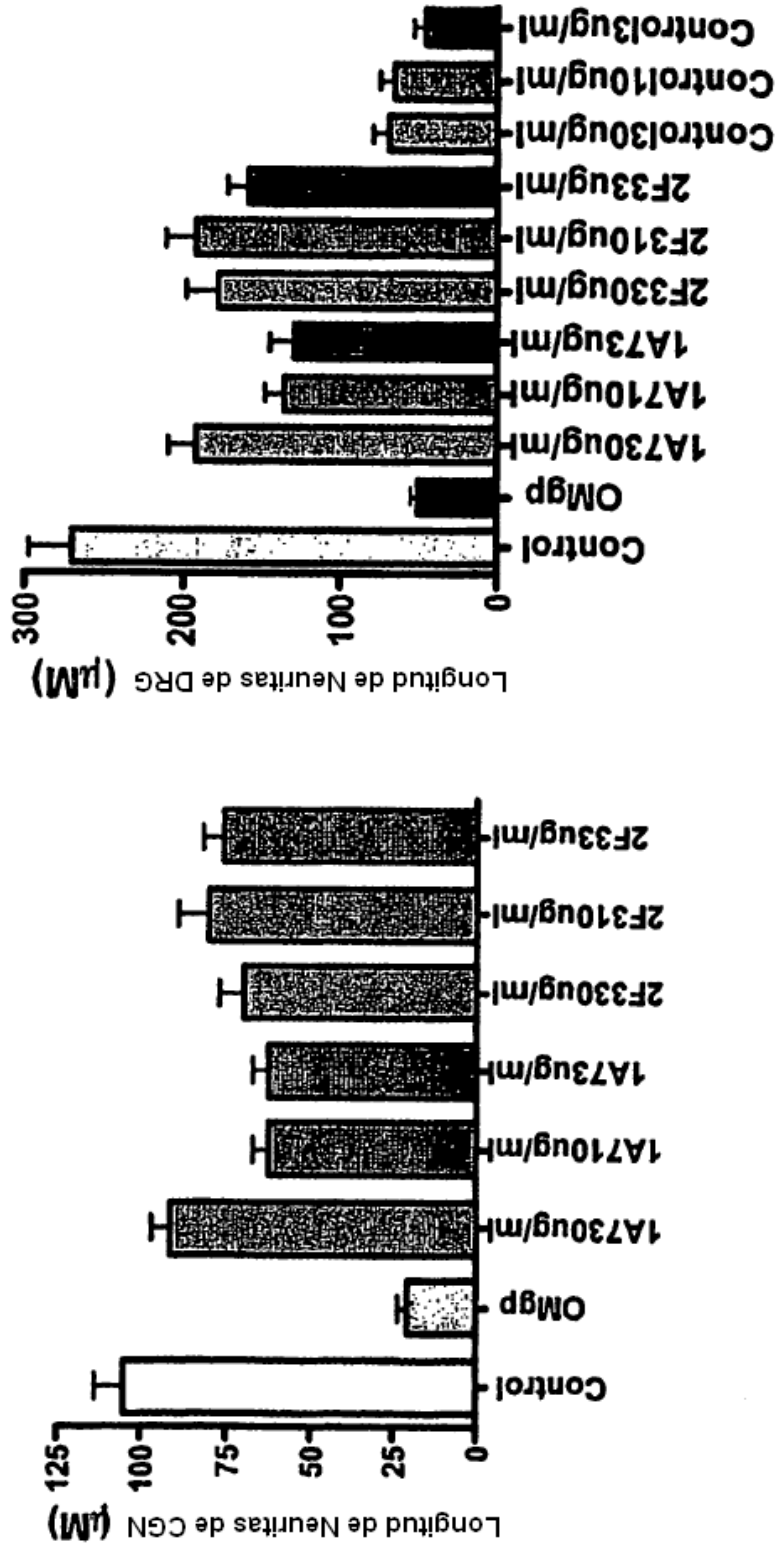


Fig 3

FIG.4: mAbs Anti-LINGO-1 Estimulan la Mielinización en Co-cultivo

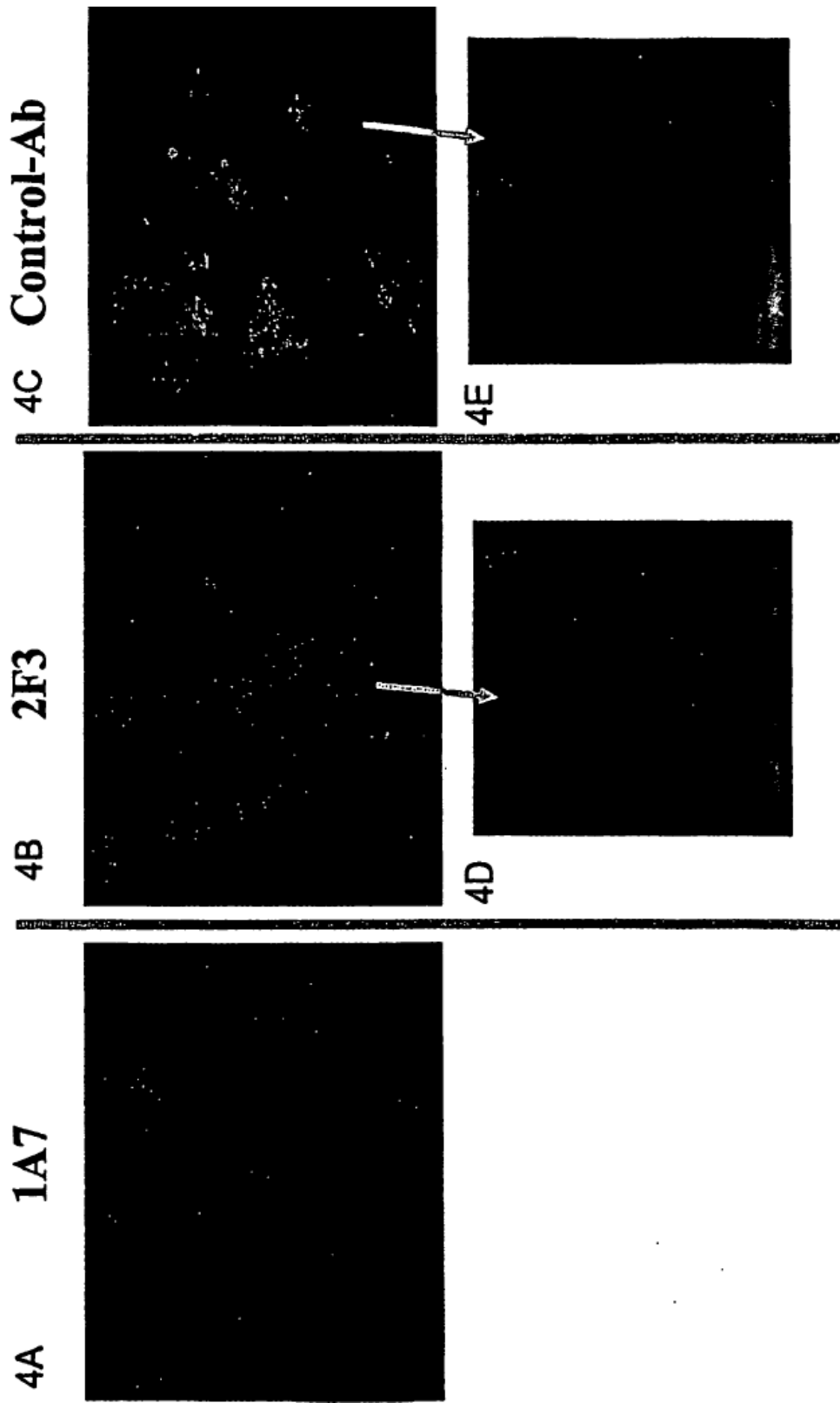
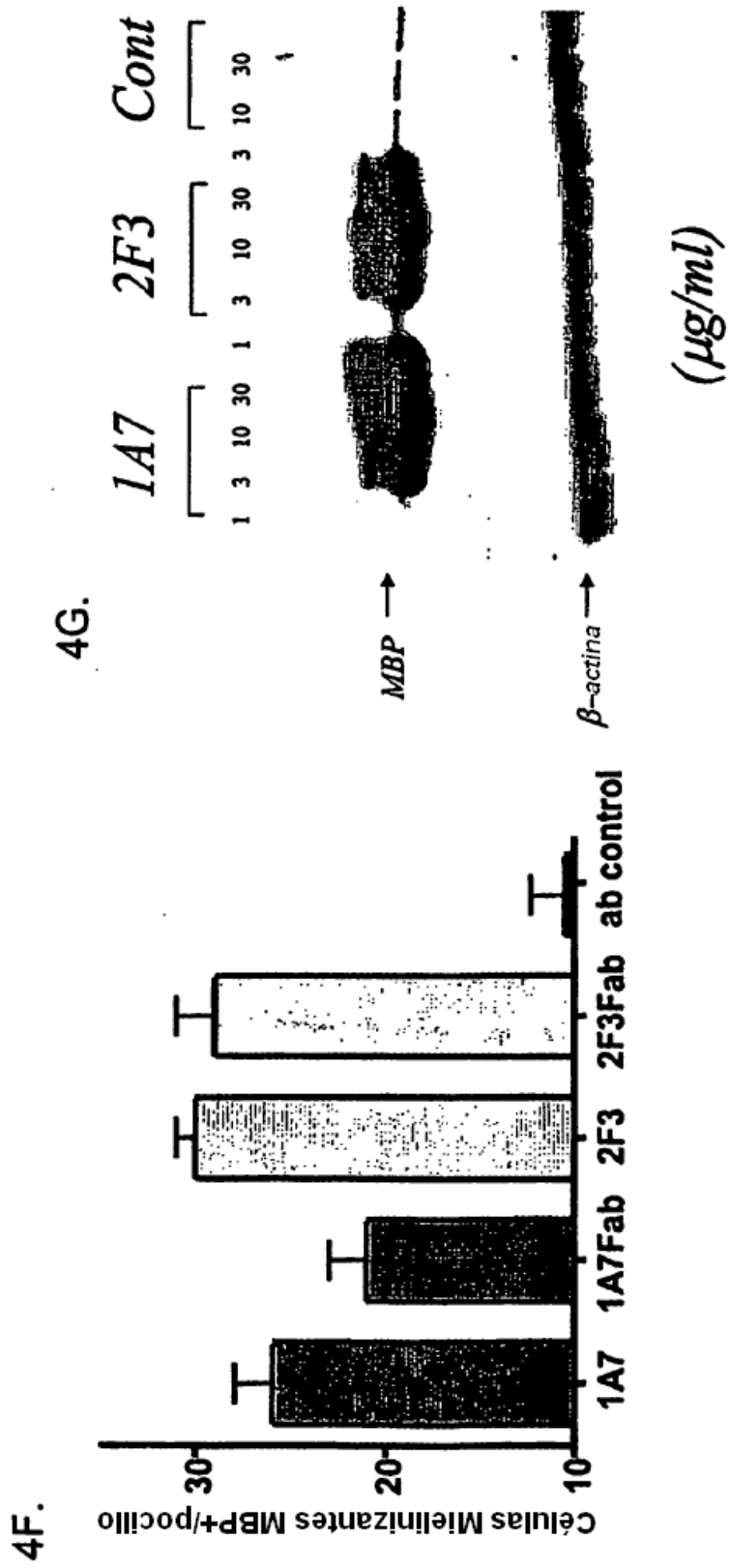
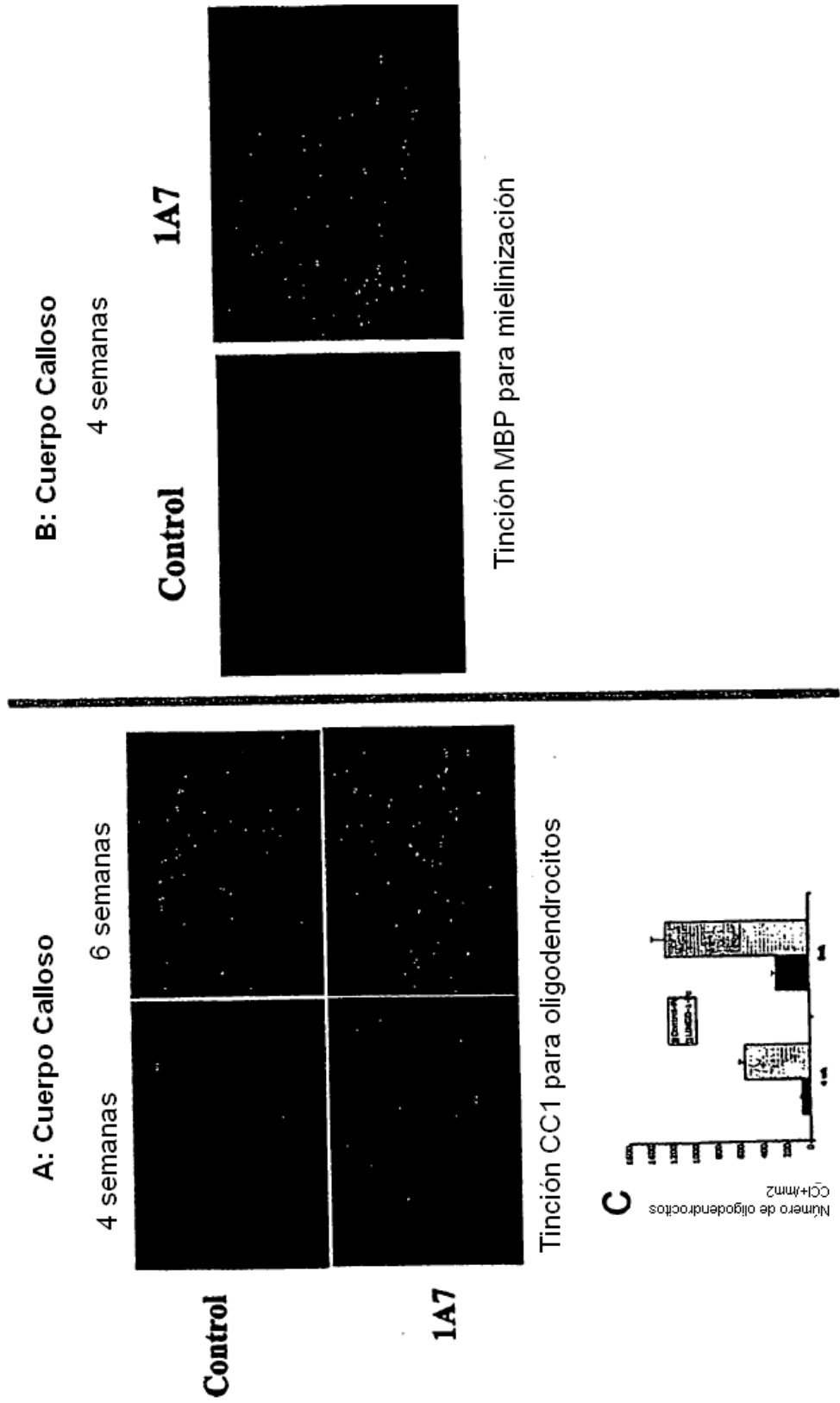


FIG.4: Anticuerpos Anti-LINGO-1 Estimulan la Mielinización en Co-cultivo





**FIG.5: 1A7 Estimula la Supervivencia de Oligodendrocitos y Remielinización en el Modelo de Cuprizona**



1A7 Estimula la Supervivencia de Neuronas RGC

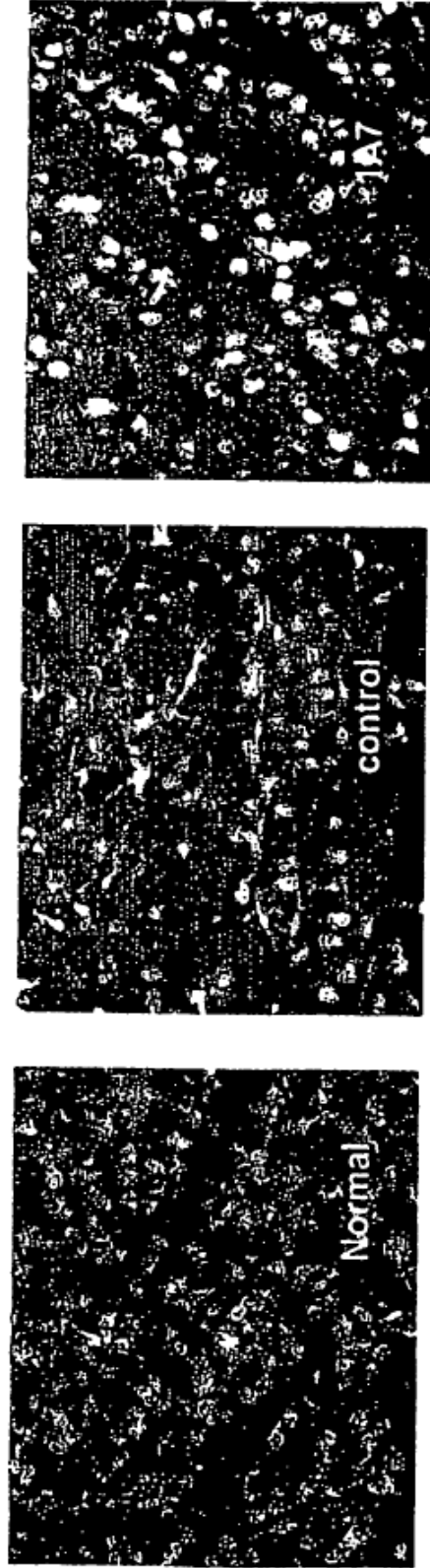


Fig 6

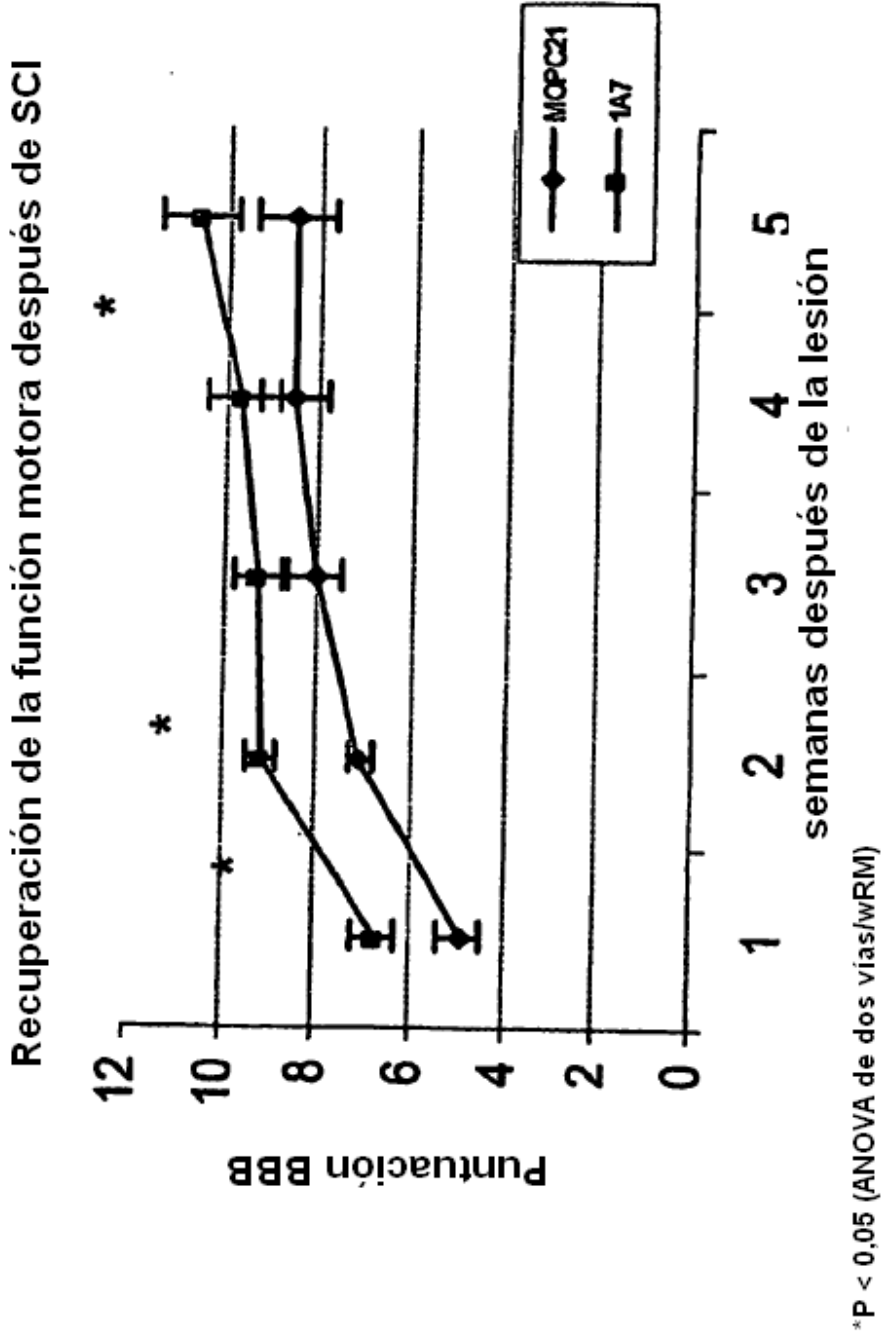


Fig 7

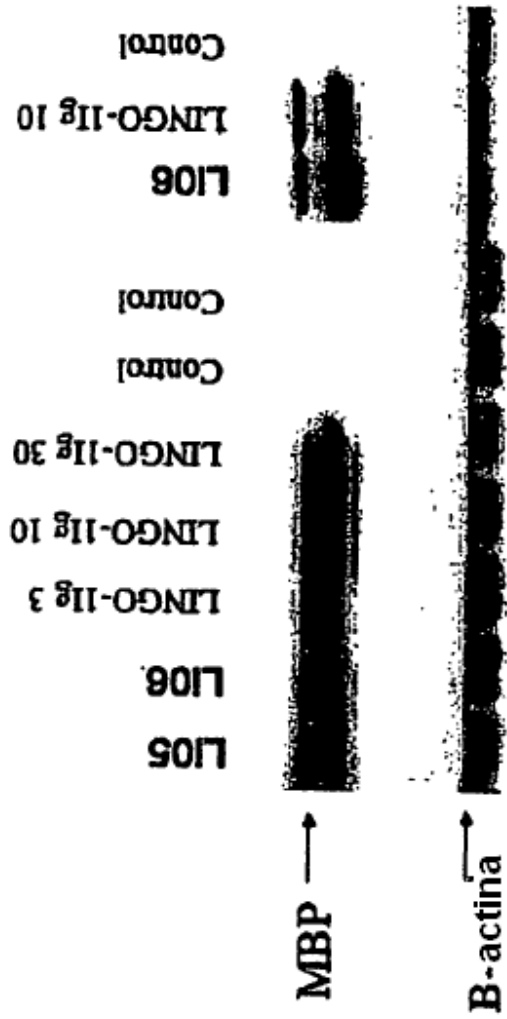
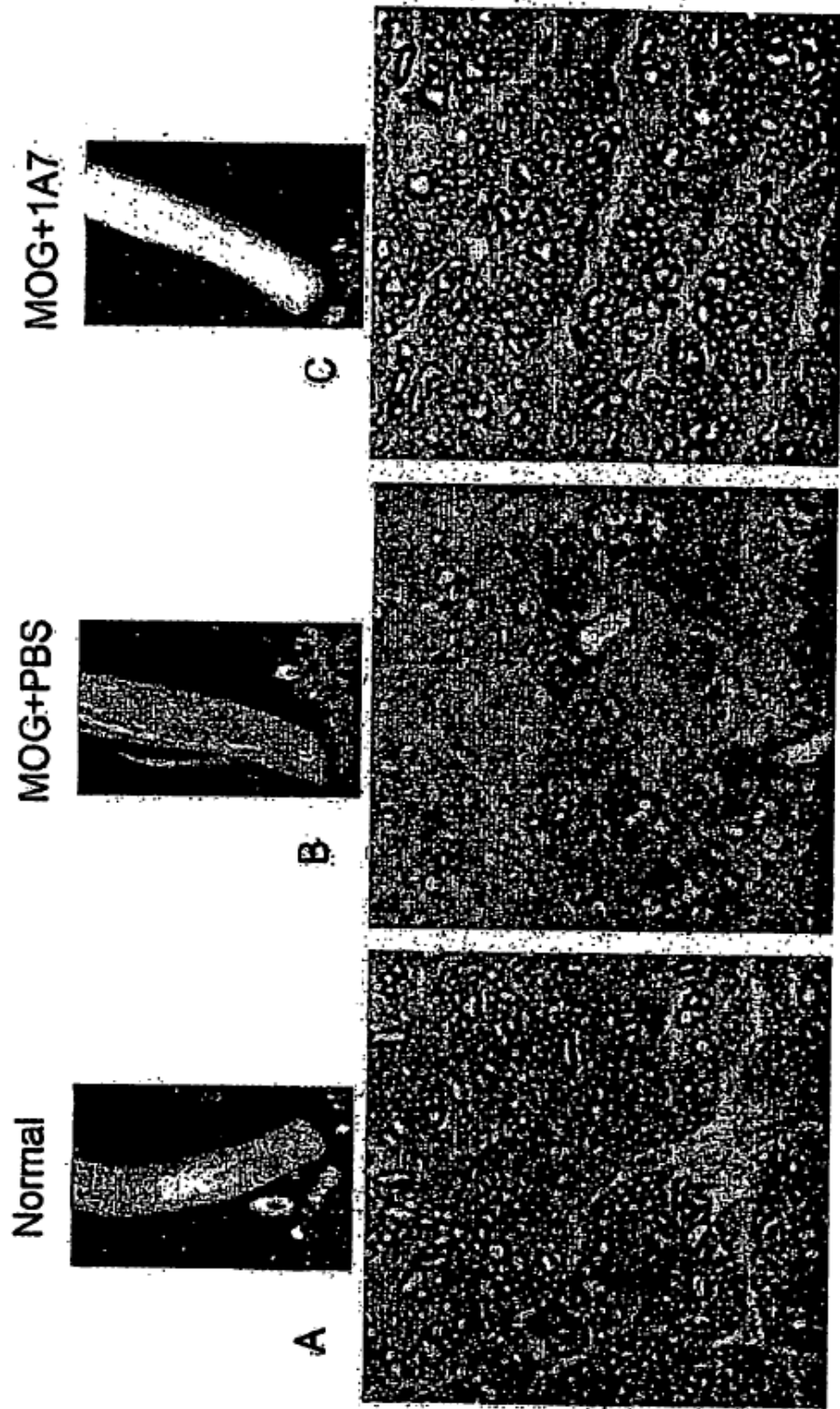
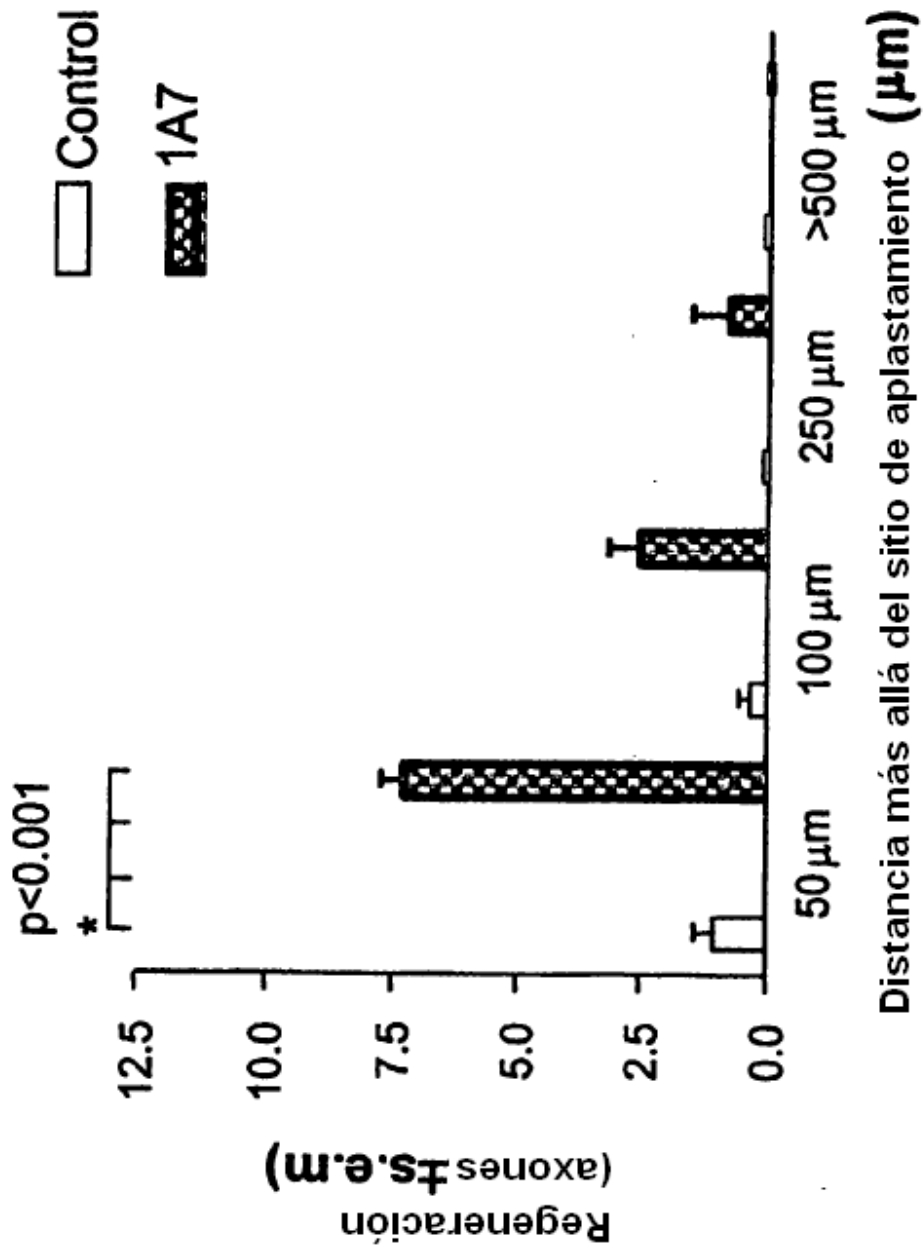


Fig 8

**El Tratamiento con 1A7 Estimula la re-mielinización y Reparación en el Modelo de Neuritis Óptica de Rata**



**FIG. 9**



**Fig. 10**