

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 110**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2007 E 07871424 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2102661**

54 Título: **Moduladores de la regeneración neuronal**

30 Prioridad:

14.11.2006 US 865772 P
16.02.2007 US 890416 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.01.2014

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

ATWAL, JASVINDER y
TESSIER-LAVIGNE, MARC

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 437 110 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

Moduladores de la regeneración neuronal

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al desarrollo neural y trastornos neurológicos. La invención se refiere específicamente a la identificación de nuevos moduladores del sistema inhibitor asociado a mielina y diversos usos de los moduladores así identificados.

10

Antecedentes de la invenciónMielina y proteínas asociadas a mielina

15 Se sabe que los axones de las neuronas del SNC de adultos tienen una capacidad muy limitada para regenerarse después de una lesión, mientras que los axones en el sistema nervioso periférico (SNP) se regeneran rápidamente. La capacidad limitada de las neuronas del SNC para regenerarse es en parte una propiedad intrínseca de los axones del SNC, pero también se debe a un ambiente no permisible. La mielina del SNC, aunque no es la única fuente de señales inhibitoras para la extensión de neuritas, contiene numerosas moléculas inhibitoras que bloquean
20 activamente el crecimiento axonal y de este modo constituye una barrera significativa a la regeneración. Se han identificado tres de dichas proteínas asociadas a mielina (MAP): Nogo (también conocida como NogoA) es un miembro de la familia de proteínas Reticulón que tienen dos dominios transmembrana; la glicoproteína asociada a mielina (MAG) es una proteína transmembrana de la superfamilia de la Ig; y OMgp es una proteína con repeticiones ricas en leucina (LRR) con un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Chen *et al.*, Nature 403: 434-39 (2000); GrandPre *et al.*, Nature 417: 439-444 (2000); Prinjha *et al.*, Nature 403: 383-384 (2000); McKerracher *et al.*, Neuron 13: 805-11 (1994); Wang *et al.*, Nature 417: 941-4 (2002); Kottis *et al.* J. Neurochem 82: 1566-9 (2002). Se ha descrito una parte de NogoA, Nogo66, como un polipéptido extracelular de 66 aminoácidos que se encuentra en las tres isoformas de Nogo.

30 A pesar de sus diferentes estructurales, se ha mostrado que las tres proteínas inhibitoras (también Nogo66) se unen al mismo receptor anclado en GPI, llamado receptor de Nogo (NgR; también conocido como Receptor de Nogo 1 o NgR1), y se ha propuesto que podría requerirse NgR para mediar en las acciones inhibitoras de Nogo, MAG y OMgp. Fournier *et al.*, Nature 409: 341-346 (2001). También se han identificado dos homólogos de NgR1 (NgR2 y NgR3). Documento US 2005/0048520 A1 (Strittmatter *et al.*), publicado el 3 de marzo de 2005. Dado que NgR es una proteína de superficie celular anclada a GPI, es poco probable que sea un transductor de señal directo (Zheng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 1205-1210 (2005)). Otros han sugerido que el receptor de neurotrofina p75^{NTR} actúa como un correceptor para NgR y proporciona el resto transductor de señal en un complejo receptor (Wang *et al.*, Nature 420: 74-78 (2002); Wong *et al.*, Nat. Neurosci. 5: 1302-1308 (2002)).

40 Sin embargo, recientes estudios del complejo receptor NgR/p75^{NTR} ha planteado interrogantes acerca del papel del NgR en el sistema inhibitor asociado a mielina. Zheng *et al.* han mostrado que la supresión genética de NgR no reduce la inhibición de neuritas *in vitro* ni promueve la regeneración del tracto corticoespinal (CST) *in vivo*. Zheng *et al.* (2005), mencionado anteriormente. Coherentemente con estos resultados, otro estudio no consiguió detectar ninguna regeneración potenciada del CST en ratones mutantes para *NgR*. Kim *et al.*, Neuron 44: 439- 451 (2004).
45 Estos hallazgos contradicen la hipótesis de que el complejo receptor NgR/p75^{NTR} representa el punto de convergencia clave para múltiples señales inhibitoras. La incapacidad de regeneración del CST en ratones mutantes para NgR contrasta con la regeneración del CST observada con animales de tipo silvestre tratados con un péptido antagonista de la interacción Nogo66/NgR (GrandPre *et al.* Nature 417: 5470551 (2002) y Li y Strittmatter, Nature 23: 4219- 4227 (2002)). Otro estudio ha mostrado que la expresión de un fragmento negativo dominante de NgR conduce a la regeneración potenciada de axones del nervio óptico en combinación con una lesión condicional. Ninguno de estos experimentos consiguió ensayar directamente la implicación de NgR, ya que ambos péptidos antagonistas tienen el potencial de interferir con otros ligandos/receptores inhibitoras.

50 Estas inconsistencias con los resultados experimentales son una fuerte indicación de que NgR, o el complejo receptor NgR/p75^{NTR}, podrían desempeñar un papel limitado en la inhibición asociada a mielina de la regeneración del SNC, y otros componentes, tales como receptores adicionales o compañeros de unión, podrían participar en la transmisión de la señal inhibitora.

PirB y ortólogos humanos

60

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I se identificó originalmente como una región que codifica una familia de moléculas que son importantes para el sistema inmunitario. Recientes pruebas han indicado que las moléculas del MHC de clase I tienen funciones adicionales en el SNC en desarrollo y del adulto. Boulanger y Shatz, Nature Rev Neurosci. 5: 521-531 (2004); documento US 2003/0170690 (Shatz y Syken), publicado el 11 de
65 septiembre de 2003. Se ha descubierto que muchos de los miembros del MHC de clase I y sus compañeros de unión se expresan en neuronas del SNC. Recientes estudios genéticos y moleculares se han centrado en las

funciones fisiológicas del MHC de clase I del SNC, y los resultados iniciales sugieren que las moléculas del MHC de clase I podrían estar implicadas en plasticidad sináptica dependiente de actividad, un proceso durante el cual la fuerza de las conexiones sinápticas existentes aumenta o se reduce en respuesta a la actividad neuronal, seguido de alteraciones estructurales a largo plazo en los circuitos. Además, la región codificante del MHC de clase I también se ha ligado genéticamente a una amplia diversidad de trastornos con síntomas neurológicos, y se cree que las funciones anómalas de las moléculas del MHC de clase I contribuyen a la alteración del desarrollo y la plasticidad normales del cerebro.

Uno de los receptores del MHC de clase I conocidos en el ambiente inmunitario es PirB, un polipéptido murino que se describió por primera vez por Kubagawa *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94: 5261- 6 (1997). El PirB de ratón tiene varios ortólogos humanos, que son miembros de la subfamilia B del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos (LILRB), y también se denominan “transcritos de tipo inmunoglobulina” (ILT). Los ortólogos humanos muestran homología significativa con la secuencia murina, en el siguiente orden de mayor a menor: LILRB3/ILT5, LILRB1/ILT2, LILRB5/ILT3, LILRB2/ILT4, y, al igual que PirB, son todos receptores inhibidores. LILRB3/ILT5 (NP_006855) y LILRB1/ILT2 (NP_006660) se describieron en primer lugar por Samaridis y Colonna, Eur. J. Immunol. 27 (3): 660- 665 (1997). LILRB5/ILT3 (NP_006831) se ha identificado por Borges *et al.*, J. Immunol. 159 (11): 5192-5196 (1997). LILRB2/ILT4 (también conocido como MIR10), se ha identificado por Colonna *et al.*, J. Exp. Med. 186: 1809-18 (1997). PirB y sus ortólogos humanos muestran un alto grado de variabilidad estructural. Las secuencias de diversas formas cortadas y empalmadas de forma alternativa están disponibles de EMBL/GenBank, incluyendo, por ejemplo, los siguientes números de referencia para ADNc de ILT4 humano: ILT4-c11 AF009634; ILT4-c117 AF11566; ILT4-c126 AF11565. Como se ha observado anteriormente, los polipéptidos de PirB/LILRB son receptores inhibidores del MHC de Clase I (MHC I), y se conocen por su papel en la regulación de la activación de células inmunitarias (Kubagawa *et al.*, mencionado anteriormente; Hayami *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 7320 (1997); Takai *et al.*, Immunology 115: 433 (2005); Takai *et al.*, Immunol. Rev. 181: 215 (2001); Nakamura *et al.* Nat. Immunol. 5: 623 (2004); Liang *et al.*, Eur. J. Immunol. 32: 2418 (2002)).

Un reciente estudio de Syken *et al.* Science 313: 1795-800 (2006)) indicó que PirB se expresa en subconjuntos de neuronas por todo el cerebro. En ratones mutantes sin PirB funcional, la plasticidad de dominancia ocular cortical (OD) se potencia significativamente a todas las edades, lo que sugiere función del PirB en la restricción de la plasticidad dependiente de actividad en el córtex visual.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente hallazgo de que PirB/LILRB son compañeros de unión para Nogo (Nogo66) y MAG, y que los antagonistas de PirB/LILRB y la actividad de PirB/LILRB reducida alteran significativamente la ruta inhibitoria asociada a mielina, promoviendo de este modo la regeneración neuronal.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un método para identificar un antagonista de PirB/LILRB que comprende poner en contacto un agente candidato con un complejo receptor que comprende PirB/LILRB y mielina o una proteína asociada a mielina, o un fragmento de la misma, y detectar la capacidad del agente candidato para inhibir la interacción entre PirB/LILRB y la proteína asociada a mielina, o fragmento de la misma, en el que el agente candidato se identifica como un antagonista si se inhibe la interacción.

En una realización, la interacción detectada es unión.

En otra realización, la interacción detectada es señalización celular.

En una realización adicional, la señalización celular da como resultado la inhibición del crecimiento de axones o la regeneración neuronal.

En una realización adicional más, la proteína asociada a mielina se selecciona del grupo que consiste en Nogo, MAG, OMgp y fragmentos de las mismas.

En otra realización, PirB/LILRB es una proteína LILRB humana, tal como LILRB1, LILRB2, LILRB3 o LILRB5.

En ciertas realizaciones específicas, PirB/LILRB se selecciona del grupo que consiste en LILRB2, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 2), LILRB2, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 14), LILRB1, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 10), LILRB1, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 11), LILRB 1, variante de transcrito 3 (SEC ID N°: 12), LILRB1, variante de transcrito 4 (SEC ID N°: 13), LILRB3, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 15), LILRB3, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 16), LILRB5, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 17). LILRB5, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 18) y LILRB5, variante de transcrito 3 (SEC ID N°: 19).

En una realización adicional, el complejo receptor comprende además NgR.

En diferentes realizaciones, el agente candidato se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas pequeñas, polisacáridos y polinucleótidos, y preferentemente es un

anticuerpo o un ARN de interferencia corto (ARNip). El anticuerpo preferentemente se une de forma específica a PirB/LILRB, tal como LIRB2, e incluye, sin limitación, anticuerpo y fragmentos de anticuerpo quiméricos, humanizados y humanos.

5 En una realización particular, el fragmento de anticuerpo se elige del grupo que consiste en fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂.

En una realización adicional, al menos uno de PirB/LILRB y la mielina o la proteína asociada a mielina, o fragmento de la misma, se inmoviliza.

10

En una realización adicional más, el ensayo es un ensayo basado en células.

En una realización particular, el ensayo basado en células comprende cultivar células neuronales con la mielina o proteína asociada a mielina, o fragmento de la misma, en presencia y ausencia de un agente candidato y determinar el cambio en la longitud de las neuritas, en el que el agente candidato se identifica como un antagonista cuando la longitud de las neuritas es mayor en presencia del agente candidato.

15

En el ensayo basado en células anterior, las células neuronales pueden ser principalmente neuronas, o pueden, por ejemplo, derivar de células o líneas celulares, incluyendo células madre, por ejemplo células madre embrionarias (ES) no humanas. En otras realizaciones, las neuronas pueden, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en neuronas granulares cerebelares, neuronas de ganglios de la raíz dorsal y neuronas corticales.

20

En una realización, los métodos descritos anteriormente comprenden además la etapa *in vitro* de usar un anticuerpo antagonista anti-PirB/LILRB que se ha identificado que potencia la extensión de neuritas, y/o promover el crecimiento, reparación y/o regeneración neuronal.

25

La invención también proporciona un anticuerpo antagonista anti-PirB/LILRB identificado anteriormente, para su uso en el tratamiento de lesión neuronal o un trastorno neurológico, que puede caracterizarse por un nervio dañado físicamente, o puede seleccionarse del grupo que consiste en daño a los nervios periféricos provocado por lesión física, o diabetes; daño físico al sistema nervioso central; daño cerebral asociado con ictus, neuralgia del trigémino, neuralgia glossofaríngea, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular progresiva, atrofia muscular heredada bulbar progresiva, síndromes de discos intervertebrales herniados, rotos y prolapsados, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de salida torácica, neuropatías periféricas, porfiria, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.

30

35

En otro aspecto más, la invención se refiere al uso de un complejo de PirB/LILRB y mielina o una proteína asociada a mielina, o un fragmento de la misma, para identificar un antagonista de PirB/LILRB.

40

En un aspecto diferente, la invención se refiere al uso de un antagonista de PirB/LILRB como se define en las reivindicaciones en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico, en el que el trastorno neurológico puede caracterizarse por un nervio dañado físicamente, o puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en daño a los nervios periféricos provocado por lesión física, o diabetes; daño físico al sistema nervioso central; daño cerebral asociado con ictus, neuralgia del trigémino, neuralgia glossofaríngea, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular progresiva, atrofia muscular heredada bulbar progresiva, síndromes de discos intervertebrales herniados, rotos y prolapsados, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de salida torácica, neuropatías periféricas, porfiria, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.

45

50

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra actividad Alcalina Fosfatasa en células COS transfectadas después de incubación con AP-Nogo66. AP-Nogo66 se une a PirB y LILRB2.

55

La Figura 2 muestra inmunorreactividad en células COS transfectadas después de incubación con MAG-Fc. MAG se une a PirB y LILRB2.

La Figura 3 muestra resultados de RT-PCR que demuestran la expresión de SMAGP, PAN-PirA y PirB en diversas partes del sistema nervioso.

Las Figuras 4A-4C confirman, mediante hibridación *in situ*, la expresión de PirB en el prosencéfalo del adulto (A), cerebelo del adulto (B) y Ganglio de la Raíz Dorsal P 10 (C).

60

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de PirB de ratón (SEC ID N°: 1) y una secuencia de aminoácidos de variante de transcrito 1 de LILRB2 humano (SEC ID N°: 2).

La Figura 6 ilustra la inhibición por Nogo66 del crecimiento de los axones, y la inversión de dicha inhibición por PirB ECD (tanto PirBFc como PirBHis). Se usaron neuronas granulares cerebelares para el ensayo.

65

La Figura 7 muestra inmunoprecipitación conjunta de PirB y NgR. NgR se precipita conjuntamente de forma robusta con PirB (panel izquierdo). El panel derecho muestra la proteína total de lisados celulares completos

inmunotransferidos con anti-NgR. Las múltiples bandas (flechas) representan NgR procesado por glicosilación en diversos grados.

La Figura 8 muestra que la inhibición por Nogo66 del crecimiento de los axones se rescata parcialmente por anticuerpos anti-PirB en neuronas granulares cerebelares.

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB1, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 10).

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB1, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 11).

La Figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB1, variante de transcrito 3 (SEC ID N°: 12).

La Figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB1, variante de transcrito 4 (SEC ID N°: 13).

La Figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB2, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 14).

La Figura 14 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB3, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 15).

La Figura 15 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB3, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 16).

La Figura 16 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB5, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 17).

La Figura 17 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB5, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 18).

La Figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos de LILRB5, variante de transcrito 3 (SEC ID N°: 19).

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

Las expresiones “receptor de tipo inmunoglobulina emparejada B” y “PirB” se usan de forma intercambiable en la presente memoria, y se refieren a una proteína inhibidora de ratón de 841 aminoácidos, de secuencia nativa, de SEC ID N°: 1 (Figura 5) (NP_035225), y sus homólogos de secuencia nativa en rata y otros mamíferos no humanos, incluyendo todas las variantes de origen natural, tales como variantes de transcrito de corte y empalme alternativo y variantes alélicas e isoformas, así como formas solubles de las mismas.

Los términos “LILRB”, “ILT” y “MIR,” se usan de forma intercambiable en la presente memoria, y se refieren a todos los miembros de la “subfamilia B del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos” humana, incluyendo todas las variantes de origen natural, tales como variantes de transcrito de corte y empalme alternativo y variantes alélicas e isoformas, así como formas solubles de las mismas. Los miembros individuales dentro de esta familia se designan por números después del acrónimo, tal como, por ejemplo, LILRB3/ILT5, LILRB1/ILT2, LILRB5/ILT3 y LILRB2/ILT4, en los que una referencia a cualquier miembro individual, a no ser que se indique de otro modo, también incluye referencia a todas las variantes de origen natural, tales como variantes de transcrito de corte y empalme alternativo y variantes alélicas e isoformas, así como formas solubles de las mismas. Por lo tanto, por ejemplo, “LILRB1” se usa en la presente memoria para incluir específicamente las variantes de transcrito 1-4 (SEC ID N°: 10, 11, 12 y 13, mostradas en las Figuras 9-12), así como todas las otras variantes de origen natural, tales como otras variantes de transcrito de corte y empalme alternativo, variantes alélicas e isoformas, y formas solubles de las mismas. El término “LILRB2” se usa en la presente memoria para incluir específicamente LILRB2, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 2, mostrada en la Figura 5) y variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 14, mostrada en la Figura 13), así como todas las otras variantes de origen natural, tales como otras variantes de transcrito de corte y empalme alternativo, variantes alélicas e isoformas, y formas solubles de las mismas. El término “LILRB3” se usa en la presente memoria para incluir específicamente LILRB3, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 15, mostrado en la Figura 14) y variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 16, mostrado en la Figura 15), así como todas las otras variantes de origen natural, tales como otras variantes de transcrito de corte y empalme alternativo, variantes alélicas e isoformas, y formas solubles de las mismas. El término “LILRB5” incluye específicamente las variantes de transcrito 1-3 (SEC ID N°: 17-19, mostradas en las Figuras 16-18), así como todas las otras variantes de origen natural, tales como otras variantes de transcrito de corte y empalme alternativo, variantes alélicas e isoformas, y formas solubles de las mismas.

El término “PirB/LILRB” se usa en la presente memoria como una descripción abreviada para hacer referencia a cualquiera de las proteínas PirB de ratón y LILRB humanas individuales y homólogos de secuencias nativas en otros mamíferos no humanos, incluyendo todas las variantes de origen natural, tales como variantes de transcrito de corte y empalme alternativo y alélicas e isoformas, así como formas solubles de las mismas.

La expresión “proteína asociada a mielina” se usa en el sentido más amplio e incluye todas las proteínas presentes en la mielina del SNC que inhiben la regeneración neuronal, incluyendo Nogo, MAG y OMgp.

“Aislado”, cuando se usa para describir las diversas proteínas desveladas en la presente memoria, significa una proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que normalmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, la proteína se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata, o (3) hasta la homogeneidad mediante técnicas de espectroscopia de masas o mapeo de péptidos. La proteína aislada incluye proteína *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del ambiente natural de la proteína en cuestión no estará presente. De forma habitual, sin embargo, la proteína aislada se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que está identificada y separada de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico en cuestión. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta a la de la forma o situación en la que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por lo tanto de las moléculas de ácido nucleico como existen en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye moléculas de ácido nucleico contenidas en células que expresan habitualmente dicho ácido nucleico cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “antagonista de PirB/LILRB” se usa para hacer referencia a un agente capaz de bloquear, neutralizar, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de PirB/LILRB. Particularmente, el antagonista de PirB/LILRB interfiere con actividades inhibitoras asociadas con mielina, potenciando de este modo la extensión de neuritas y/o promoviendo el crecimiento, reparación y/o regeneración neuronal. En una realización preferida, el antagonista de PirB/LILRB inhibe la unión de PirB/LILRB con Nogo66 y/o MAG y/u OMgp uniéndose a PirB/LILRB. Los antagonistas de PirB/LILRB incluyen, por ejemplo, anticuerpos para PirB/LILRB y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, fragmentos truncados o solubles de PirB/LILRB, Nogo 66, MAG u OMgp que son capaces de secuestrar la unión entre PirB/LILRB y Nogo 66, o entre PirB/LILRB y MAG, o entre PirB/LILRB y OMgp y moléculas pequeñas inhibitoras de la ruta inhibitora relacionada con PirB/LILRB. Los antagonistas de PirB/LILRB también incluyen moléculas de ARN de interferencia corto (ARNip) capaces de inhibir o reducir la expresión de ARNm de PirB/LILRB.

El termino “anticuerpo” en la presente memoria se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos intactos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiere producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624- 628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581- 597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria incluyen anticuerpos privatizados que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo Monos del Viejo Mundo, Simios etc.) y secuencias de región constante humana.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente que comprende la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento o fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo “intacto” es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor

se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Esas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv), en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en la presente memoria se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir los restos 24-34, 50-56 y 89-97 en el dominio variable de cadena ligera y 31-35, 50-65 y 95-102 en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir los restos 26-32, 50-52 y 91-96 en el dominio variable de cadena ligera y 26-32, 53-55 y 96-101 en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). En ambos casos, los restos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, mencionado anteriormente, como se analiza en más detalle posteriormente. Los restos de "marco" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos de las regiones hipervariables como se definen en la presente memoria.

Un "anticuerpo parental" o anticuerpo de "tipo silvestre" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que carece de una o más alteraciones de secuencia de aminoácidos en comparación con una variante de anticuerpo como se desvela en la presente memoria. Por lo tanto, el anticuerpo parental generalmente tiene al menos una región hipervariable que difiere en su secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región hipervariable correspondiente de una variante de anticuerpo como se desvela en la presente memoria. El polipéptido parental puede comprender un anticuerpo de secuencia nativa (es decir uno de origen natural) (incluyendo una variante alélica de origen natural), o un anticuerpo con modificaciones de secuencia de aminoácidos preexistentes (tales como inserciones, deleciones y/u otras alteraciones) de una secuencia de origen natural. A lo largo de la divulgación, se usan de forma intercambiable anticuerpo "de tipo silvestre", "WT", "wt" y "parental".

Como se usa en la presente memoria, "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo parental. Preferentemente, la variante de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada o un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza. Dichas variantes necesariamente tienen menos del 100 % de identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo parental. En una realización preferida, la variante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 75 % a menos del 100 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferentemente de aproximadamente el 80 % a menos del 100 %, más preferentemente de aproximadamente el 85 % a menos del 100 %, más preferentemente de aproximadamente el 90 % a menos del 100 %, y más preferentemente de aproximadamente el 95 % a menos del 100 %. La variante de anticuerpo es generalmente una que comprende una o más alteraciones de aminoácidos en o adyacente a una o más regiones hipervariables del mismo.

Una "alteración de aminoácidos" se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos predeterminada. Las alteraciones a modo de ejemplo incluyen inserciones, sustituciones y deleciones. Una "sustitución de aminoácidos" se refiere al reemplazo de un resto de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada; con otro resto de aminoácido diferente.

Un resto de aminoácido "de reemplazo" se refiere a un resto de aminoácido que reemplaza o sustituye otro resto de aminoácido en una secuencia de aminoácidos. El resto de reemplazo puede ser un resto de aminoácido de origen natural o de origen no natural.

Una "inserción de aminoácidos" se refiere a la introducción de uno o más restos de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos predeterminada. La inserción de aminoácidos puede comprender una "inserción peptídica" en cuyo caso se introduce un péptido que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos por enlace o enlaces peptídicos en la secuencia de aminoácidos predeterminada. Cuando la inserción de aminoácidos implica inserción de un péptido, el péptido insertado puede generarse por mutagénesis aleatoria de modo que tenga una secuencia de aminoácidos que no existe en la naturaleza. Una alteración de aminoácidos "adyacente a una región hipervariable" se refiere a la introducción o sustitución de uno o más restos de aminoácidos en el extremo N terminal y/o C terminal de una región hipervariable, de modo que al menos uno del resto o los restos de aminoácidos insertados o de reemplazo formen un enlace peptídico con el resto de aminoácido N terminal o C terminal de la

región hipervariable en cuestión.

Un “resto de aminoácido de origen natural” es uno codificado por el código genético, generalmente seleccionado del grupo que consiste en: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val).

Un “resto de aminoácido de origen no natural” en la presente memoria es un resto de aminoácido distinto de los restos de aminoácidos de origen natural enumerados anteriormente, que puede unirse covalentemente al resto o restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Los ejemplos de restos de aminoácidos de origen no natural incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de restos de aminoácidos tales como los descritos en Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991). Para generar dichos restos de aminoácidos de origen no natural, pueden usarse los procedimientos de Noren *et al.* Science 244: 182 (1989) y Ellman *et al.*, mencionado anteriormente. Brevemente, estos procedimientos implican activar químicamente un ARNt supresor con un resto de aminoácido de origen no natural mediante transcripción y traducción *in vitro* del ARN.

A lo largo de la presente divulgación, se hace referencia al sistema de numeración de Kabat, E. A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)). En estos compendios, Kabat enumera muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subclase, y enumera el aminoácido que aparece más habitualmente para cada posición de resto en esa subclase. Kabat usa un método para asignar un número de resto a cada aminoácido en una secuencia enumerada, y este método para asignar los números de resto se ha convertido en un patrón en este campo. En la presente descripción se sigue el sistema de numeración de Kabat. Para fines de la presente invención, para asignar números de restos a una secuencia de aminoácidos de anticuerpo candidato que no está incluida en el compendio de Kabat, se siguen las siguientes etapas. Generalmente, la secuencia candidata se alinea con cualquier secuencia de inmunoglobulina o cualquier secuencia consenso en Kabat. El alineamiento puede realizarse manualmente, o mediante ordenador usando programas informáticos habitualmente aceptados; un ejemplo de dicho programa es el programa Align 2. El alineamiento puede facilitarse usando algunos restos de aminoácidos que son habituales para la mayoría de secuencias de Fab. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada tienen normalmente cada una dos cisteínas que tienen los mismos números de restos; en el dominio V_L las dos cisteínas están normalmente en los números de resto 23 y 88, y en el dominio V_H los dos restos de cisteína se numeran normalmente 22 y 92. Los restos marco generalmente, pero no siempre, tienen aproximadamente el mismo número de restos, sin embargo las CDR variarán de tamaño. Por ejemplo, en el caso de una CDR de una secuencia candidata que es mayor que la CDR en la secuencia de Kabat con la que se alinea, normalmente se añaden sufijos al número del resto para indicar la inserción de restos adicionales (véase, por ejemplo restos 100abc en la Figura 1B). Para secuencias candidatas que, por ejemplo, se alinean con una secuencia de Kabat para los restos 34 y 36 pero no tienen restos entre ellos para alinearse con el resto 35, el número 35 simplemente no se asigna a un resto.

Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo con una “alta afinidad” es un anticuerpo que tiene una K_D, o constante de disociación, en el intervalo nanomolar (nM) o mejor. Una K_D en el “intervalo nanomolar o mejor” puede indicarse por X nM, en el que X es un número menor de aproximadamente 10.

La expresión “fago filamentosos” se refiere a una partícula viral capaz de presentar un polipéptido heterogéneo en su superficie, e incluye, sin limitación, f1, fd, Pf1 y M13. El fago filamentosos puede contener un marcador seleccionable tal como tetraciclina (por ejemplo, “fd-tet”). Los expertos en la materia conocen bien diversos sistemas de presentación de fagos filamentosos (véase, por ejemplo, Zacher *et al.* Gene 9: 127-140 (1980), Smith *et al.* Science 228: 1315-1317 (1985); y Parmley y Smith Gene 73: 305-318 (1988)).

El término “selección” se usa para referirse a los múltiples ciclos de procedimiento de exploración en la identificación y aislamiento de fagos que portan compuestos, tales como anticuerpos, con alta afinidad y especificidad por una diana.

La expresión “ARN de interferencia corto (ARNip)” se refiere a ARN bicatenarios pequeños que interfieren con la expresión génica. Los ARNip son un intermedio de interferencia de ARN, el proceso por el que el ARN bicatenario silencia genes homólogos. Los ARNip normalmente están comprendidos por dos ARN bicatenarios de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud que forman un complejo, que puede incluir un saliente o salientes monocatenarios. El procesamiento del ARN bicatenario por un complejo enzimático, por ejemplo por polimerasas, da como resultado la escisión del ARN bicatenario para producir ARNip. La cadena antisentido del ARNip se usa por un complejo de silenciamiento de interferencia de ARN (ARNi) para guiar la escisión de ARNm, promoviendo de este modo la degradación de ARNm. Para silenciar un gen específico usando ARNip, por ejemplo en una célula de mamífero, la región que forma pares de bases se selecciona para evitar complementariedad aleatoria con un ARNm no relacionado. Se han identificado en la técnica complejos de silenciamiento de ARNi, tal como, por ejemplo, por Fire *et al.*, Nature 391: 806- 811 (1998) y McManus *et al.*, Nat. Rev. Genet. 3 (10): 737- 47 (2002).

La expresión “ARN de interferencia (ARNi)” se usa en el presente documento para referirse a un ARN bicatenario que da como resultado degradación catalítica de ARNm específicos, y por lo tanto puede usarse para inhibir/reducir la expresión de un gen particular.

5 El término “polimorfismo” se usa en la presente memoria para referirse a más de una forma de un gen o una parte (por ejemplo, variante alélicas) del mismo. Una parte de un gen de la que hay al menos dos formas diferentes se denomina “región polimórfica” del gen. Una secuencia genética específica en una región polimórfica de un gen es un “alelo”. Una región polimórfica puede ser de un único nucleótido, que difiere en diferentes alelos, o puede ser de varios nucleótidos de longitud.

10 Como se usa en la presente memoria, el término “trastorno” en general se refiere a cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con los compuestos de la presente invención, incluyendo cualquier enfermedad o trastorno que pueda tratarse mediante cantidades eficaces de antagonistas de PirB/LILRB. Los ejemplos no limitantes de trastornos para tratar en la presente memoria incluyen, sin limitación, enfermedades y afecciones que se benefician de la potenciación de la extensión de neuritas, promoción del crecimiento, reparación o regeneración neuronal, incluyendo trastornos neurológicos, tales como nervios dañados físicamente y enfermedades neurodegenerativas. Dichos trastornos incluyen específicamente daño a los nervios periféricos causado por lesión física, o patologías tales como diabetes; daño físico al sistema nervioso central (médula espinal y cerebro); daño cerebral asociado con ictus; y trastornos neurológicos que se relacionan con la neurodegeneración, tales como, por ejemplo, neuralgia del trigémino, neuralgia glossofaríngea, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular progresiva, atrofia muscular heredada bulbar progresiva, síndromes de discos intervertebrales herniados, rotos o prolapsados, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de salida torácica, neuropatías periféricas tales como las provocadas por plomo, dapsona, garrapatas, porfiria, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o enfermedad de Parkinson.

25 Los términos “tratar”, “tratamiento” y “terapia” como se usan en la presente memoria se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica, y terapia preventiva. El tratamiento o la administración consecutiva se refieren al tratamiento al menos diariamente sin interrupción en el tratamiento de uno o más días. El tratamiento o la administración intermitente, o tratamiento o administración de manera intermitente, se refieren al tratamiento que no es consecutivo, sino de naturaleza cíclica.

30 La expresión “que previene neurodegeneración”, como se usa en la presente memoria incluye (1) la capacidad para inhibir o prevenir la neurodegeneración en pacientes a los que se acaba de diagnosticar que tienen una enfermedad neurodegenerativa o en riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa y (2) la capacidad para inhibir o prevenir neurodegeneración adicional en pacientes que ya padecen, o tienen síntomas de, una enfermedad neurodegenerativa.

40 El término “mamífero” como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier mamífero clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, primates no humanos superiores, roedores, animales domésticos y de granja tales como vacas, caballos, perros y gatos. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ser humano.

45 La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para efectuar resultados terapéuticos beneficiosos o deseados (incluyendo preventivos). Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones.

50 Como se usa en la presente memoria, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se usan de forma intercambiable y todas estas designaciones incluyen descendencia. Por lo tanto, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. El término “descendencia” se refiere a todos y cada uno de los descendientes de cada generación posterior a una célula o línea celular transformada originalmente. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se explora en la célula transformada originalmente está incluida. Cuando se pretenden designaciones distintas, resultará evidente a partir del contexto.

60 “Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias identificadas de la presente memoria se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica. Se pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo asignar algoritmos necesarios para conseguir el máximo alineamiento a lo largo de las secuencias de longitud

completa que se comparan. Para fines de la presente memoria, los valores de porcentaje de identidad de aminoácidos pueden obtenerse usando el programa informático de comparación de secuencias, ALIGN-2, que fue creado por Genentech, Inc. y cuyo código fuente se ha registrado con la documentación de usuario en la Oficina de Copyright de Estados Unidos, Washington, DC, 20559, registrado con el N° de Registro de Copyright de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación la puede determinar fácilmente un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración salina. En general, sondas más largas requieren temperaturas mayores para hibridación apropiada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas menores. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridar cuando están presentes cadenas complementarias en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de identidad deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se entiende que las temperaturas relativas mayores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las temperaturas de reacción las harían menos. Para detalles adicionales y explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones de alta rigurosidad", como se definen en la presente memoria se identifican por las que: (1) emplean fuerza iónica baja y temperatura alta para el lavado; cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante; formamida 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino 0,1 %/Ficoll 0,1 %/polivinilpirrolidona 0.1 %/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1 %, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS 0,1 % y dextrán sulfato 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida 50 % a 55 °C, seguido de lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55 °C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen incubación durante una noche a 37 °C en una solución que comprende: formamida 20 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, dextrán sulfato 10 x y ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido de lavado de los filtros en SSC 1 x a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la materia reconocerá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente con una secuencia codificante si se posiciona de modo que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Se define en la presente memoria que una "molécula pequeña" tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 1000 Dalton, preferentemente por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

B. Ensayos de exploración para identificar estimuladores de la regeneración neuronal

Los ensayos primarios de la presente invención se basan al menos en parte en el reconocimiento de que PirB/LILRB es un receptor de las proteínas de mielina Nogo (Nogo66) y MAG, y que los antagonistas de PirB/LILRB, interfieren con la asociación de PirB/LILRB con Nogo y/o MAG, son capaces de potenciar la extensión de neuritas, y/o promover el crecimiento, reparación y/o regeneración neuronal. Brevemente, dichos agentes se denominarán en la presente memoria estimuladores de la regeneración neuronal.

Pueden diseñarse ensayos de exploración para candidatos farmacológicos antagonistas para identificar compuestos que se unan o formen complejo con PirB/LILRB, o interfieran de otro modo con la interacción de PirB/LILRB con Nogo, MAG u otros miembros del sistema inhibitor asociado a mielina. Los ensayos de exploración proporcionados en la presente memoria incluyen ensayos susceptibles de exploración de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos adecuados para identificar moléculas pequeñas candidatas farmacológicas. Generalmente, se proporcionan ensayos de unión y ensayos de actividad.

Los ensayos pueden realizarse en diversos formatos, incluyendo, sin limitación, ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de exploración bioquímica, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos para antagonistas son comunes porque requieren poner en contacto el candidato farmacológico con un polipéptido de PirB/LILRB en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que estos dos componentes interactúen.

En los ensayos de unión, la interacción es de unión, y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido PirB/LILRB o el candidato farmacológico está inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo, una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se consigue recubriendo la superficie sólida con una solución del polipéptido de PirB/LILRB y secando. Como alternativa, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido de PirB/LILRB para inmovilizar puede usarse para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede marcarse con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción se completa, se retiran los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, lavando, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se ha producido la formación de complejo. Cuando el componente no inmovilizado originalmente no porta un marcador, puede detectarse la formación de complejos, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente con el complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato es un polipéptido que interactúa con pero no se une a PirB/LILRB, la interacción de PirB/LILRB con el polipéptido respectivo puede ensayarse por métodos bien conocidos para detectar las interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, entrecruzamiento, inmunoprecipitación conjunta y purificación conjunta a través de gradientes o columnas de cromatografía. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse usando un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (Londres), 340: 245- 246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578- 9582 (1991)) como se desvela en Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5789- 5793 (1991). Muchos activadores de la transcripción, tales como GAL4 de levadura consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, el otro que actúa como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones anteriores (generalmente denominado el "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana está fusionada con el dominio de unión a ADN de GAL4, y otra, en la que se fusionan proteínas activadoras candidatas con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 mediante interacción proteína-proteína. Se detectan colonias que contienen polipéptidos que interactúan con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos está disponible en el mercado de Clontech. Este sistema también puede extenderse para mapear dominios proteicos implicados en interacciones proteicas específicas así como para señalar restos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de PirB/LILRB y otros componentes intra o extracelulares, en particular Nogo o MAG pueden ensayarse como sigue. Habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene PirB/LILRB y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permiten la interacción de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la interacción de PirB/LILRB y Nogo o MAG, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción, para actuar como un control positivo.

Se enfatiza que los ensayos de exploración analizados específicamente en la presente memoria son solamente para ilustración. Se conocen bien por parte de los expertos en la materia otros diversos ensayos que pueden seleccionarse dependiendo del tipo de los candidatos antagonistas explorados (por ejemplo, polipéptidos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas no peptídicas, ácidos nucleicos, etc.) y son igualmente adecuados para los fines de la presente invención.

Los ensayos de la presente memoria pueden usarse para explorar bibliotecas de compuestos, incluyendo, sin limitación, bibliotecas químicas, bibliotecas de productos naturales (por ejemplo colecciones de microorganismos, animales, plantas, etc.) y bibliotecas combinatorias comprendidas por péptidos aleatorios, oligonucleótidos o

moléculas orgánicas pequeñas. En una realización particular, los ensayos en la presente memoria se usan para explorar bibliotecas de anticuerpo, incluyendo, sin limitación, bibliotecas de anticuerpos humanos vírgenes, recombinantes, sintéticos y semisintéticos. La biblioteca de anticuerpos puede, por ejemplo, ser una biblioteca de presentación de fagos, incluyendo bibliotecas monovalentes, que presentan de media un anticuerpo monocatenario o fragmento de anticuerpo por partícula de fago, y bibliotecas multivalentes, que presentan, de media, dos o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo por partícula viral. Sin embargo, las bibliotecas de anticuerpo para explorar de acuerdo con la presente invención no se limitan a bibliotecas de presentación de fagos. Otra técnica de presentación incluye, por ejemplo, presentación de ribosomas o ARNm (Mattheakis *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9022-9026 (1994); Hanes y Pluckthun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937-4942 (1997)), presentación de células microbianas, tales como presentación bacteriana (Georgiou *et al.*, Nature Biotech. 15: 29-34 (1997)), o presentación de células de levadura (Kieke *et al.*, Protein Eng. 10: 1303-1310 (1997)), presentación en células de mamífero, presentación en esporas, presentación viral, tal como presentación retroviral (Urban *et al.*, Nucleic Acids Res. 33: e35 (2005), presentación basada en enlace de proteína-ADN (Odegrip *et al.*, Proc. Acad. Natl. Sci. USA 101: 2806-2810 (2004); Reiersen *et al.*, Nucleic Acids Res. 33: e10 (2005)), y presentación en micropérlas (Sepp *et al.*, FEBS Lett. 532: 455-458 (2002)).

Los resultados obtenidos en los ensayos de interacción/unión primaria en la presente memoria pueden confirmarse en ensayos *in vitro* y/o *in vivo* de regeneración neuronal. Como alternativa, pueden usarse ensayos *in vitro* y/o *in vivo* de regeneración neuronal como ensayos primarios para identificar los antagonistas de PirB/LILRB en la presente memoria.

Se conocen bien en la técnica ensayos *in vitro* de extensión de neuritas y se describen, por ejemplo, en Jin y Strittmatter, J Neurosci 17: 6256-6263 (1997); Fournier *et al.*, Methods Enzymol. 325: 473-482 (2000); Zheng *et al.*, Neuron 38: 213-224 (2003); Wang *et al.*, Nature 417: 941-944 (2002), y Neumann *et al.*, Neuron 34: 885-893 (2002)). Están disponibles en el mercado kits para medir y cuantificar la extensión de neuritas. Por lo tanto, por ejemplo, el Kit de Ensayo de Extensión de Neuritas de CHEMICON (número de Catálogo NS200) usa tecnología de filtro microporoso para el ensayo cuantitativo de compuestos que influyen en la formación y repulsión de neuritas. Con este sistema, es posible explorar agentes biológicos y farmacológicos simultáneamente, evaluar directamente las funciones de receptor de adhesión y guía responsables de la extensión y repulsión de neuritas, así como el análisis de la función génica en células transfectadas. El filtro microporoso permite la separación bioquímica y purificación de neuritas y cuerpos celulares para análisis molecular detallado de la expresión proteica, procesos de transducción de señal e identificación de dianas farmacológicas que regulan los procesos de extensión o retracción de neuritas.

En un protocolo típico, se cultivan neuronas primarias aisladas de tejido neural de roedor (incluyendo neuronas granulares cerebelares, neuronas de los ganglios de las raíces dorsales y neuronas corticales) en placas de cultivo de 96 pocillos recubiertas con mielina completa o proteínas asociadas a mielina (por ejemplo, Nogo66, MAG y/o OMgp). Después de un tiempo definido en cultivo, normalmente 24-48 horas, las neuronas se fijan con paraformaldehído al 4 % y se tiñen con un marcador neuronal (anti tubulina de clase III b, Covance). Se realizan después adquisición y análisis de imágenes usando el sistema de captura de imágenes automático ImageXpress (Molecular Devices). Los datos se analizan con respecto a cambios en la longitud de neuritas total o máxima por neurona.

Los ensayos *in vivo* incluyen modelos animales de diversas enfermedades neurodegenerativas, tales como modelos de lesión de la médula espinal, modelos de plasticidad en córtex visual y otros modelos conocidos en la técnica. Por lo tanto, la regeneración y plasticidad pueden estudiarse en modelos de plasticidad siguiendo piramidotomía unilateral y modelos de lesión cerebral traumática. Otros modelos de neurodegeneración incluyen modelos de ratón de esclerosis múltiple, tales como encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE), modelos de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), tal como el ratón mutante de SOD1, modelos de animales transgénicos de enfermedad de Alzheimer y modelos animales de enfermedad de Parkinson.

C. Preparar anticuerpos que actúan como estimuladores de la regeneración neuronal

Los anticuerpos identificados por los ensayos de unión y actividad de la presente invención pueden producirse mediante métodos conocidos en este campo, incluyendo técnicas de tecnología de ADN recombinante.

(i) Preparación de antígenos

Pueden usarse antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden usarse fragmentos de estos (por ejemplo el dominio extracelular de un receptor) como el inmunógeno. Como alternativa, pueden usarse células que expresen la molécula transmembrana como el inmunógeno. Dichas células pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia.

(ii) Anticuerpos policlonales

Preferentemente se inducen anticuerpos policlonales en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en la especie para inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación mediante restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ en la que R y R_1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días después se extrae sangre de los animales y el suero se ensaya con respecto a título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título alcanza una meseta. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o mediante un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo celular recombinante como fusiones proteicas. Además, se usan de forma adecuada agentes agregantes tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

(iii) Anticuerpos monoclonales

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster o un macaco, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en la presente memoria para inducir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente a la proteína usada para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59- 103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan eficazmente, apoyan la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, son líneas celulares de mieloma preferidas líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, California, Estados Unidos y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. Estados Unidos. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Se ensaya un medio de cultivo en el que se cultivan células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de líquido ascítico en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se preparan de forma adecuada a partir del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma actúan como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se usan para transfectar células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Se describirá en más detalle posteriormente la producción recombinante de anticuerpos.

En una realización adicional, pueden aislarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de bibliotecas de fago de anticuerpo generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990).

Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) mediante redistribución de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicionales para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. Estados Unidos*, 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina.

Normalmente dichos polipéptidos no inmunoglobulina sustituyen los dominios constantes de un anticuerpo, o sustituyen los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpo quiméricos (Patente de Estados N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado "de mejor ajuste", la secuencia de dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana más cercana a la del roedor se acepta después como el marco conservado (FR) humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse de las secuencias receptoras importadas de modo que se consigue la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de CDR están directamente y más

sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión a antígenos.

Como alternativa, es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, tras su inmunización, producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión a cadena pesada del anticuerpo (J.sub.H) en ratones mutantes de línea quimérica y germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la serie génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras su exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255- 258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); y Duchosal *et al.* Nature 355: 258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden derivar de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581- 597 (1991); Vaughan *et al.* Nature Biotech 14: 309 (1996)). La generación de anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos se describe adicionalmente posteriormente.

(v) Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). En otra realización como se describe en el ejemplo posterior, el F(ab')₂ se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula F(ab')₂. De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente de un cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase documento WO 93/16185.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes, cuando los epítomos son habitualmente de antígenos diferentes. Aunque dichas moléculas normalmente se unirán solamente a dos epítomos diferentes (es decir anticuerpos biespecíficos, BsAb), cuando se usa en la presente memoria esta expresión abarca anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos. Los ejemplos de BsAb incluyen los de una rama dirigida contra PirB/LILRB y otra rama dirigida contra Nogo o MAG u OMgp. Un ejemplo adicional de BsAb incluye los de una rama dirigida contra PirB/LILRB y otra rama dirigida contra NgR.

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad, es más bien incómoda, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991). De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales dé como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de importancia particular.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se descubrió que esta estructura simétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de

inmunoglobulina en solamente la mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

5 De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivo celular recombinante. El interfaz preferido comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales mayores (por ejemplo tirosina o
10 triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con unas más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

15 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado con avidina, el otro con biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los
20 agentes de entrecruzamiento adecuados se conocen bien en la técnica y se desvelan en la Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*,
25 *Science* 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que se escinden anticuerpos intactos de forma proteolítica para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejo con ditiol arsenita sódica para estabilizar ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos
30 pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos de Fab'-SH también pueden recuperarse directamente de *E. coli*, y pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217- 225 (1992) describe la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.
35

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148 (5): 1547- 1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444- 6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios VH y VL de un fragmento a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol*, 152: 5368 (1994).
40
45
50

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tuft *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).
55

(vii) Modificación por ingeniería genética de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a su función efectora, para potenciar la eficacia del anticuerpo. Por ejemplo pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176: 1191- 1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Pueden prepararse también anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando entrecruzadores heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.* *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede obtenerse por ingeniería genética un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y pueda tener de este modo lisis de complemento y capacidades de
60
65

ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.* *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

(viii) Fusiones de epítomos de unión a receptor de recuperación de anticuerpos

5 En ciertas realizaciones de la invención, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración tumoral, por ejemplo. En este caso, puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítomo de unión a receptor de recuperación en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo mediante mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítomo en un marcador peptídico que se fusiona después con el fragmento de anticuerpo en uno de los extremos o en el medio, por ejemplo, por síntesis de ADN o péptidos).

15 El epítomo de unión de receptor de recuperación preferentemente constituye una región en la que uno cualquiera o más restos de aminoácidos de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Aún más preferentemente, se transfieren tres o más restos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferentemente, el epítomo se toma del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o V.sub.H, o más de una región tal, del anticuerpo. Como alternativa, el epítomo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región CL o región VL, o ambas, del fragmento de anticuerpo.

20 (ix) Otras modificaciones covalentes de anticuerpos

25 Se incluyen modificaciones covalentes de anticuerpos dentro del alcance de la presente invención. Pueden realizarse por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar restos de aminoácidos diana del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N o C terminales. Se describen ejemplos de modificaciones covalentes en la Patente de Estados Unidos Nº 5.534.615, incorporada específicamente en la presente memoria por referencia. Un tipo preferido de modificación covalente del anticuerpo comprende unión del anticuerpo con uno de diversos polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

(x) Generación de anticuerpos de bibliotecas de fagos de anticuerpos sintéticos

35 En una realización preferida, la invención proporciona un método para generar y seleccionar nuevos anticuerpos usando un único enfoque de presentación de fagos. El enfoque implica generación de bibliotecas de fagos de anticuerpos sintéticos basándose en molde de un único armazón, diseño de suficientes diversidades dentro de los dominios variables, presentación de polipéptidos que tienen los dominios variables diversificados, selección de anticuerpos candidatos con alta afinidad para dirigirse al antígeno, y aislamiento de los anticuerpos seleccionados.

40 Pueden encontrarse detalles de los métodos de presentación de fagos, por ejemplo, en el documento WO03/102157 publicado el 11 de diciembre de 2003, cuya divulgación completa se incorpora expresamente en la presente memoria por referencia.

45 En un aspecto, las bibliotecas de anticuerpo usadas en la invención pueden generarse mutando las posiciones accesibles al disolvente y/o altamente diversas en al menos una CDR de un dominio variable de anticuerpo. Algunas o todas las CDR pueden mutarse usando los métodos proporcionados en la presente memoria. En algunas realizaciones, puede ser preferible generar diversas bibliotecas de anticuerpos mutando las posiciones en CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una única biblioteca o mutando las posiciones en CDRL3 y CDRH3 para formar una única biblioteca o mutando las posiciones en CDRL3 y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una única biblioteca.

50 Puede generarse una biblioteca de dominios variables de anticuerpo, por ejemplo, que tiene mutaciones en las posiciones accesibles al disolvente y/o altamente diversas de CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Puede generarse otra biblioteca que tenga mutaciones en CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Estas bibliotecas también pueden usarse juntas entre sí para generar agentes de unión de afinidades deseadas. Por ejemplo, después de uno o más ciclos de selección de bibliotecas de cadena pesada para unión con un antígeno diana, una biblioteca de cadena ligera puede reemplazarse en la población de agentes de unión de cadena pesada para ciclos adicionales de selección para aumentar la afinidad de los agentes de unión.

60 Preferentemente, se crea una biblioteca mediante sustitución de los aminoácidos originales con aminoácidos variantes en la región CDRH3 de la región variable de la secuencia de cadena pesada. La biblioteca resultante puede contener una pluralidad de secuencias de anticuerpo, en la que la diversidad de secuencias está principalmente en la región CDRH3 de la secuencia de cadena pesada.

65 En un aspecto, la biblioteca se crea en el contexto de la secuencia de anticuerpo humanizado 4D5, o la secuencia de los aminoácidos flanqueantes de la secuencia de anticuerpo humanizado 4D5. Preferentemente, la biblioteca se

crea por sustitución de al menos los restos 95-100a de la cadena pesada con aminoácidos codificados por el conjunto de codones *DVK*, en la que el conjunto de codones *DVK* se usa para codificar un conjunto de aminoácidos variantes para cada una de estas posiciones. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*DVK*)₇. En algunas realizaciones, se crea una biblioteca mediante sustitución de los restos 95-100a con aminoácidos codificados por los conjuntos de codones tanto *DVK* como *NNK*. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*DVK*)₆ (*NNK*). En otra realización, se crea una biblioteca por sustitución de al menos los restos 95-100a con aminoácidos codificados por los conjuntos de codones tanto *DVK* como *NNK*. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*DVK*)₅ (*NNK*). Otro ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*NNK*)₆. Otros ejemplos de secuencias oligonucleotídicas adecuadas pueden determinarse por un experto en la materia de acuerdo con los criterios descritos en la presente memoria.

En otra realización, se utilizan diseños de CDRH3 diferentes para aislar agentes de unión de alta afinidad y para aislar agentes de unión para diversos epítomos. El intervalo de longitudes de CDRH3 generadas en esta biblioteca es de 11 a 13 aminoácidos, aunque también pueden generarse longitudes diferentes a esta. La diversidad H3 puede expandirse usando conjuntos de codones *NNK*, *DVK* y *NVK*, así como diversidad más limitada en el extremo N y/o C terminal.

También puede generarse diversidad en CDRH1 y CDRH2. Los diseños de las diversidades de CDR-H1 y H2 siguen la estrategia de dirigirse a imitar el repertorio de anticuerpos naturales descrito con modificación que se centra en la diversidad más cercanamente coincidente con la diversidad natural que el diseño previo.

Para la diversidad en CDRH3, pueden construirse múltiples bibliotecas por separado con diferentes longitudes de H3 y después combinarse para seleccionar agentes de unión para dirigirse a antígenos. Las múltiples bibliotecas pueden agruparse y clasificarse usando métodos de selección de soporte sólido y clasificación de solución como se ha descrito previamente y en la presente memoria posteriormente. Pueden emplearse múltiples estrategias de clasificación. Por ejemplo, una variación implica clasificar en diana unida a un sólido, seguido de clasificar un marcador que puede estar presente en el polipéptido de fusión (por ejemplo marcador anti gD) y seguido de otra clasificación en diana unida a sólido. Como alternativa, las bibliotecas pueden clasificarse en primer lugar en diana unida a una superficie sólida, los agentes de unión eluidos se clasifican después usando unión de fase de solución con concentraciones decrecientes de antígeno diana. La utilización de combinaciones de diferentes métodos de clasificación posibilita la minimización de la selección de secuencias solo altamente expresadas y posibilita la selección de varios clones de alta afinidad diferentes.

Pueden aislarse de las bibliotecas agentes de unión de alta afinidad para el antígeno diana. La limitación de la diversidad en la región H1/H2 reduce la degradación de aproximadamente 10⁴ a 10⁵ veces y permitir más diversidad H3 posibilita más agentes de unión de alta afinidad. La utilización de bibliotecas con diferentes tipos de diversidad en CDRH3 (por ejemplo la utilización de *DVK* o *NVT*) posibilita el aislamiento de agentes de unión que pueden unirse a diferentes epítomos de un antígeno diana.

De los agentes de unión aislados de las bibliotecas agrupadas como se ha descrito anteriormente, se ha descubierto que la afinidad puede mejorarse adicionalmente proporcionando diversidad limitada en la cadena ligera. La diversidad de cadena ligera se genera en esta realización como sigue en CDRL1: la posición de aminoácido 28 se codifica por RDT; la posición de aminoácido 29 se codifica por RKT; la posición de aminoácido 30 se codifica por RVW; la posición de aminoácido 31 se codifica por ANW; la posición de aminoácido 32 se codifica por THT; opcionalmente, la posición de aminoácido 33 se codifica por CTG; en CDRL2: la posición de aminoácido 50 se codifica por KBG; la posición de aminoácido 53 se codifica por AVC; y opcionalmente, la posición de aminoácido 55 se codifica por GMA; en CDRL3: la posición de aminoácido 91 se codifica por TMT o SRT o ambos; la posición de aminoácido 92 se codifica por DMC; la posición de aminoácido 93 se codifica por RVT; la posición de aminoácido 94 se codifica por NHT; y la posición de aminoácido 96 se codifica por TWT o YKG o ambos.

En otra realización, se genera una biblioteca o bibliotecas con diversidad en las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3. En esta realización, se genera diversidad en CDRH3 usando diversas longitudes de regiones H3 y usando principalmente los conjuntos de codones *XYZ* y *NNK* o *NNS*. Pueden formarse bibliotecas usando oligonucleótidos individuales y agrupados o los oligonucleótidos pueden agruparse para formar un subconjunto de bibliotecas. Las bibliotecas de la presente realización pueden clasificarse frente a diana unida a sólido. Pueden explorarse clones aislados de múltiples clasificaciones con respecto a especificidad y afinidad usando ensayos de ELISA. Para especificidad, los clones pueden explorarse frente a los antígenos diana deseados así como otros antígenos no diana. Los agentes de unión para el antígeno diana pueden explorarse después con respecto a afinidad en ensayo ELISA de competición de unión en solución o ensayo de competición puntual. Los agentes de unión de alta afinidad pueden aislarse de la biblioteca utilizando conjuntos de codones *XYZ* preparados como se ha descrito anteriormente. Estos agentes de unión pueden producirse fácilmente como anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno en alto rendimiento en cultivo celular.

En algunas realizaciones, puede ser deseable generar bibliotecas con una mayor diversidad de longitudes de la región CDRH3. Por ejemplo, puede ser deseable generar bibliotecas con regiones CDRH3 que varíen de 7 a 19 aminoácidos.

5 Se producen fácilmente agentes de unión de alta afinidad aislados de las bibliotecas de estas realizaciones en cultivo bacteriano y de células eucariotas con alto rendimiento. Los vectores pueden diseñarse para retirar fácilmente secuencias tales como marcadores gD, secuencia componente de proteína de recubrimiento viral y/o para añadir secuencias de región constante para proporcionar producción de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno en alto rendimiento.

10 Puede combinarse una biblioteca con mutaciones en CDRH3 con una biblioteca que contenga versiones variantes de otras CDR, por ejemplo CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 I y/o CDRH2. Por lo tanto, por ejemplo, en una realización, una biblioteca de CDRH3 se combina con una biblioteca de CDRL3 creada en el contexto de la secuencia del anticuerpo 4D5 humanizado con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 29, 30,31 y/o 32 usando conjuntos de codones predeterminados. En otra realización, una biblioteca con mutaciones para la CDRH3 puede combinarse con una biblioteca que comprende dominios variables de cadena pesada CDRH1 y/o CDRH2 variantes. En una realización, la biblioteca de CDRH1 se crea con la secuencia 4D5 de anticuerpo humanizado con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 30, 31, 32 y 33. Puede crearse una biblioteca de CDRH2 con la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5 con aminoácidos variantes en las posiciones 50, 52, 53, 54, 56 y 58 usando los conjuntos de codones predeterminados.

(xi) Mutantes de anticuerpos

25 Los nuevos anticuerpos generados de bibliotecas de fagos pueden modificarse adicionalmente para generar mutantes de anticuerpos con mejores propiedades físicas, químicas y/o biológicas que el anticuerpo parental. Cuando el ensayo usado sea un ensayo de actividad biológica, el mutante de anticuerpo preferentemente tiene una actividad biológica en el ensayo elegido que es al menos aproximadamente 10 veces mejor, preferentemente al menos aproximadamente 20 veces mejor, más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces mejor, y en ocasiones al menos aproximadamente 100 veces o 200 veces mejor, que la actividad biológica del anticuerpo parental en ese ensayo. Por ejemplo, un mutante de anticuerpo anti-PirB/LILRB preferentemente tiene una afinidad de unión por PirB/LILRB que es al menos aproximadamente 10 veces más fuerte, preferentemente al menos aproximadamente 20 veces más fuerte, más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces más fuerte, y en ocasiones al menos aproximadamente 100 o 200 veces más fuerte, que la afinidad de unión del anticuerpo parental.

35 Para generar el anticuerpo mutante, se introducen una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo sustituciones) en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo parental. Como alternativa, o además, pueden introducirse una o más alteraciones (por ejemplo sustituciones) de restos de región marco conservada en el anticuerpo parental cuando estas den como resultado una mejora de la afinidad de unión del mutante de anticuerpo para el antígeno de la segunda especie de mamífero. Los ejemplos de restos de región marco conservada para modificar incluyen los que se unen de forma no covalente directamente con el antígeno (Amit *et al.* (1986) Science 233: 747-753); interaccionan con/efectúan la conformación de una CDR (Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917) y/o participan en la interfaz V_L - V_H (documento EP 239 400B1). En ciertas realizaciones, la modificación de uno o más de dichos restos de región marco conservada da como resultado una potenciación de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Por ejemplo, de aproximadamente uno a 45 aproximadamente cinco restos de marco conservado pueden alterarse en esta realización de la invención. En ocasiones, esto puede ser suficiente para producir un mutante de anticuerpo adecuado para su uso en ensayos preclínicos, incluso cuando no se ha alterado ninguno de los restos de región hipervariable. Normalmente, sin embargo, el mutante de anticuerpo comprenderá una alteración o alteraciones de región hipervariable adicionales.

50 Los restos de región hipervariable que se alteran pueden cambiarse aleatoriamente, especialmente cuando la afinidad de unión de partida del anticuerpo parental sea tal que dichos mutantes de anticuerpo producidos de forma aleatoria puedan explorarse fácilmente.

55 Un procedimiento útil para generar dichos mutantes de anticuerpo se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" (Cunningham y Wells (1989) Science 244: 1081-1085). Aquí, se reemplazan uno o más de los restos de región hipervariable por resto o restos de alanina o polialanina para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno de la segunda especie de mamífero. Ese resto o restos de región hipervariable que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo mutaciones adicionales u otras en o para los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácido está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Los mutantes de ala producidos de este modo se exploran con respecto a su actividad biológica como se describe en la presente memoria.

65 Normalmente se comenzaría con una sustitución conservativa tal como las mostradas posteriormente bajo el título de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión), entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados "sustituciones a modo

de ejemplo” en la siguiente tabla, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos explorados.

Sustituciones preferidas:

5

Resto Original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se consiguen aún más modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de los anticuerpos seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

10

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr, asn, gln;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

15

20 Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

En otra realización, los sitios seleccionados para modificación se maduran por afinidad usando la presentación de fagos (véase anteriormente).

25

Las moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de secuencias de aminoácidos se preparan por diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una versión mutante preparada anteriormente o una no mutante del anticuerpo parental. El método preferido para preparar mutantes es mutagénesis dirigida (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488).

30

En ciertas realizaciones, el mutante de anticuerpo tendrá solamente un único resto de región hipervariable sustituido. En otras realizaciones, se habrán sustituido dos o más de los restos de región hipervariable del anticuerpo parental, por ejemplo de aproximadamente dos a aproximadamente diez sustituciones de región hipervariable.

- 5 Habitualmente, el mutante de anticuerpo con propiedades biológicas mejoradas tendrá una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 75 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente el menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % y más preferentemente al menos 95 %. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir el mismo resto) o similares (es decir resto de aminoácido del mismo grupo basado en propiedades de cadena lateral comunes, véase anteriormente) a los restos de anticuerpos parentales, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. No se interpretará que ninguna de las extensiones, 10 deleciones o inserciones N terminales, C terminales o internas en la secuencia de anticuerpos fuera del dominio variable afecta a la identidad o similitud de secuencia.

- Después de la producción del mutante de anticuerpo, se determina la actividad biológica de esa molécula en relación con el anticuerpo parental. Como se ha observado anteriormente, esto puede implicar determinar la afinidad de unión y/u otras actividades biológicas del anticuerpo. En una realización preferida de la invención, se prepara un panel de mutantes de anticuerpo y se explora con respecto a afinidad de unión por el antígeno o un fragmento del mismo. Uno o más de los mutantes de anticuerpo seleccionados de esta exploración inicial se someten 20 opcionalmente a uno o más ensayos de actividad biológica adicionales para confirmar que el mutante o los mutantes de anticuerpo con afinidad de unión potenciada son de hecho útiles, por ejemplo para estudios preclínicos.

- 25 El mutante o los mutantes de anticuerpo seleccionados de este modo pueden someterse a modificaciones adicionales, con frecuencia dependiendo del uso pretendido del anticuerpo. Dichas modificaciones pueden implicar alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, fusión con polipéptido o polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes tales como las elaboradas posteriormente. Con respecto a alteraciones de secuencia de aminoácidos, se han elaborado anteriormente modificaciones a modo de ejemplo. Por ejemplo, cualquier resto de 30 cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del mutante de anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv). Otro tipo de mutante de aminoácido tiene un patrón de glicosilación alterado. Esto puede conseguirse suprimiendo uno o 35 más restos de carbohidratos hallados en el anticuerpo y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de anticuerpos está normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de 40 asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas 45 anteriormente descritas (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

(xii) Producción recombinante de anticuerpos

- 50 Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Estas disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin 55 limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción (por ejemplo como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.534.615, incorporada específicamente en la presente memoria por referencia).

- 60 Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en la presente memoria son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 65

266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

5 Además de los procariontes, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpos microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadero común, es la usada más habitualmente entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, están disponibles habitualmente y son útiles en la presente memoria varios otros géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; yarrowia (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Derivan de organismos multicelulares células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado. Los ejemplos de células invertebradas incluyen células vegetales y de insectos. Se ha identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles públicamente diversas cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori*, y dichos virus pueden usarse como los virus de la presente memoria de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de cercopiteco verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

40 Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

45 Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Son adecuados medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) para cultivar las células hospedadoras. Además, puede usarse cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/D0195; o Patente de Estados Unidos N° de Re. 30.985 como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultará evidente para el experto habitual en la materia,

60 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos en partículas, bien de células hospedadoras o de células lisadas, se retira, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar usando un filtro de concentración proteica disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse

antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basen en cadenas pesadas gamma 1, gamma 2 o gamma 4 humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para gamma 3 humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio poroso controlado o poli(estirendivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) es útil para purificación. También están disponibles otras técnicas para purificación proteica tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoco, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo para recuperar.

D. Usos de estimuladores de la regeneración neuronal

Se cree que las moléculas identificadas en los ensayos de exploración de la presente invención encuentran uso como agentes para potenciar la supervivencia o inducir el crecimiento de células nerviosas. Son, por lo tanto, útiles en la terapia de trastornos degenerativos del sistema nervioso ("enfermedades neurodegenerativas"), incluyendo, por ejemplo, daño a los nervios periféricos provocado por lesión física (por ejemplo, quemaduras, heridas) o patologías tales como diabetes; disfunción renal o por los efectos tóxicos de productos quimioterapéuticos usados para tratar el cáncer y el SIDA; daño físico al sistema nervioso central (médula espinal y cerebro); daño cerebral asociado con ictus; y trastornos neurológicos relacionados con neurodegeneración, tales como, por ejemplo, neuralgia del trigémino, neuralgia glossofaríngea, Parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular progresiva, atrofia muscular heredada bulbar progresiva, síndromes de discos intervertebrales herniados, rotos y prolapsados, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de salida torácica, neuropatías periféricas tales como las provocadas por plomo, dapsona, garrapatas, porfiria, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Huntington o enfermedad de Parkinson.

Los compuestos identificados en la presente memoria también son útiles como componentes de medio de cultivo para su uso en el cultivo de células nerviosas *in vitro*.

Finalmente, las preparaciones que comprenden compuestos identificados por los ensayos en la presente memoria son útiles como patrones en ensayos de unión competitiva cuando se marcan con radioyodo, enzimas, fluoróforos, marcadores de espín y similares.

Las formulaciones terapéuticas de los compuestos de la presente memoria se preparan para almacenamiento mezclando el compuesto identificado (tal como un anticuerpo) que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente), en forma de una torta liofilizada o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o PEG.

Los compuestos para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril, antes de o después de liofilización y reconstitución.

Las composiciones terapéuticas pueden colocarse en un recipiente que tenga un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o frasco que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Los compuestos identificados por los ensayos de la presente invención pueden combinarse opcionalmente con o administrarse de forma concertada con factores neurotróficos incluyendo NGF, NT-3 y/o BDNF y usarse con otras terapias convencionales para trastornos nerviosos degenerativos.

La vía de administración es de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo inyección o infusión por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica o por sistemas de liberación prolongada como se observa posteriormente.

5 Para su uso intracerebral, los compuestos pueden administrarse de forma continua por infusión en los depósitos de fluido del SNC, aunque es aceptable una inyección de embolada. Los compuestos se administran preferentemente en los ventrículos del cerebro o se introducen de otro modo en el SNC o líquido cefalorraquídeo. La administración puede realizarse mediante un catéter interno usando un medio de administración continua tal como una bomba, o puede administrarse por implantación, por ejemplo, implantación intracerebral, de un vehículo de liberación
10 prolongada. Más específicamente, los compuestos pueden inyectarse a través de cánulas implantadas de forma crónica o infundirse de forma crónica con la ayuda de minibombas osmóticas. Están disponibles bombas subcutáneas que suministran proteínas a través de un tubo pequeño a los ventrículos cerebrales. Bombas altamente sofisticadas pueden recargarse a través de la piel y su velocidad de suministro puede establecerse sin intervención quirúrgica. Son ejemplos de protocolos de administración y sistemas de suministro adecuados que implican un dispositivo de bomba subcutáneo o infusión intracerebroventricular continua a través de un sistema de suministro farmacológico implantado totalmente los usados para la administración de dopamina, agonistas de dopamina y agonistas colinérgicos para pacientes de Alzheimer y modelos animales para enfermedad de Parkinson descritos por Harbaugh, J. Neural Transm. Suppl., 24: 271 (1987); y DeYebenes, *et al.*, Mov. Disord. 2: 143 (1987).

20 Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles, polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman, *et al.*, 1983, Biopolymers 22: 547), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer, *et al.*, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167; Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98), etilen vinil acetato (Langer, *et al.*, *Id.*) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxitútrico (documento EP 133.988A). Las composiciones de liberación prolongada también incluyen compuestos atrapados en liposomas, que pueden prepararse por métodos conocidos por sí mismos (Epstein, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 3688 (1985); Hwang, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324A). Habitualmente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstrom)
25 en el que el contenido lipídico es mayor de aproximadamente 30 % molar de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia óptima.

Una cantidad eficaz de un compuesto activo para emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y la condición del paciente. En consecuencia, será necesario para el terapeuta titular la dosificación y modificar la vía de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 µg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Normalmente, el especialista químico administrará un compuesto activo hasta que se alcance una dosificación que repare, mantenga y, óptimamente, restablezca la función neuronal. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por ensayos convencionales.

40 Se ilustran detalles adicionales de la invención por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

45 LILRB2 de clonación de expresión

Para identificar nuevos receptores para proteínas de mielina inhibitoras, se tomó un enfoque de clonación de la expresión. Como cebo, se generaron construcciones que fusionaban Alcalina Fosfatasa (AP) con el extremo N y/o C terminal de los siguientes inhibidores de mielina caracterizados (ADNc humano usado): Nogo66, dos dominios inhibidores adicionales de NogoA (NiR<delta>D2 y NiG<delta>20) (Oertle T, J Neurosci. 2003, 23(13): 5393-406), MAG, y OMgp. Estas construcciones se transfectaron en células 293 para producir medio acondicionado (en DMEM/FBS 2%) que contenía las proteínas cebo. La biblioteca de ADNc usada en la exploración estaba comprendida por clones de ADNc humanos de longitud completa en vectores listos para expresión generados por Origene. Estos ADNc se compilaron, dispusieron y agruparon. Se transfectaron de forma transitoria grupos de
55 aproximadamente 100 ADNc en células COS7.

En particular, el Día 1, las células COS7 se sembraron en placas a una densidad de 85.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos. El Día 2, se transfectó 1 mg de ADNc agrupados por pocillo usando el reactivo de transfección basado en lípidos FuGENE 6 (Roche). El Día 4, se realizó exploración. Brevemente, el medio de cultivo se retiró de las células y se reemplazó con 0,5 ml de medio acondicionado para células 293 que contenía proteínas cebo de fusión con AP (20-50 nM). Se incubaron células a temperatura ambiente durante 90 minutos. Las células se lavaron después 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron durante 7 minutos con paraformaldehído al 4%, se lavaron 3 veces en solución salina tamponada con HEPES (HBS), y se inactivaron por calor a 65 °C durante 90 minutos para destruir la actividad AP endógena. Las células se lavaron una vez en Tampón de AP (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris 100 mM pH 9,5), y se incubaron en sustrato cromogénico (Azul de Western, Promega), y se analizaron con respecto a la presencia de producto de reacción 1 hora después de la incubación, y

de nuevo después de la incubación durante una noche. Las células positivas se identificaron por la presencia de precipitado azul oscuro sobre la superficie de la membrana. Los grupos positivos se degradaron adicionalmente para identificar clones positivos individuales por ciclos posteriores de exploración.

5 A partir de la exploración, se identificaron los siguientes aciertos positivos:

El cebo de MAG-AP produjo 4 aciertos positivos. Uno fue el Receptor de Nogo caracterizado previamente (Fournier *et al.*, Nature 409, 342- 346 (2001). Dos de estos aciertos fueron enzimas de procesamiento glicolítico, y se consideró poco probable que fueran importantes. El cuarto se anotó como "proteína hipotética de *Homo sapiens* del clon 643 (LOC57228), ARNm". Un análisis más preciso del ADNc reveló una ORF alternativa que era homóloga de la proteína previamente descrita SMAG.

15 El cebo de AP-Nogo66 produjo 2 aciertos positivos. Uno fue el Receptor de Nogo previamente caracterizado. El otro fue "receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos de *Homo sapiens*, subfamilia B (con dominios TM e ITIM), miembro 2 (LILRB2), ARNm" (SEC ID N°: 2). Este gen también se conoce por múltiples nomenclaturas alternativas, incluyendo MIG10, ILT4 y LIR2 (Kubagawa *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5261-6 (1997); Colonna *et al.*, J. Exp. Med. 186: 1809-18 (1997)).

20 Ejemplo 2

AP-Nogo66 se une a PirB y LILRB2

Para confirmar la unión de Nogo66 con LILRB2 (SEC ID N°: 2), y para ensayar si Nogo66 se une a PirB ortólogo murino (SEC ID N°: 1), se llevaron a cabo ensayos de unión similares a los descritos en el Ejemplo 1. Brevemente, se transfectaron células COS7 con ADNc que codificaban PirB, LILRB2 o NgR como un control positivo. 48 horas después de la transfección, las células se incubaron con medio acondicionado para células 293 que contenía AP-Nogo66 durante 90 minutos a TA. Las células se lavaron exhaustivamente, se fijaron y se neutralizó la actividad AP endógena por inactivación por calor. Las células se hicieron reaccionar después con sustrato cromogénico (Azul de Western, Promega).

30 Como se muestra en la Figura 1, se detectó una fuerte señal positiva en células que expresaban tanto PirB como LILRB2.

35 Ejemplo 3

MAG se une a PirB y LILRB2

Para ensayar si MAG también se une o no a PirB y LILRB2, se realizaron ensayos de unión con MAG-Fc, que se cree que es más bioactivo que MAG-AP. Las células COS7 se transfectaron con ADNc que codificaban PirB, LILRB2, o mSMAGP como un control positivo. 48 horas después de la transfección, las células se incubaron con medio acondicionado para células 293 que contenía MAG-Fc durante 90 minutos a TA. Las células se lavaron cuatro veces con Solución Salina Tamponada de Hank (HBSS), se fijaron durante cinco minutos con paraformaldehído al 2%, se lavaron cuatro veces con HBSS, y se bloquearon durante 15 minutos con suero de cabra inactivado por calor al 10% (HIGS) en HBSS. Las células se incubaron después durante una hora con anticuerpo anti Fc humano (1: 500, Jackson Immunochemicals), se lavaron con HIGS 10% en PBS, y se incubaron con anticuerpo secundario (anti ratón de cabra conjugado con 568 AlexaFluor, Molecular Probes). Las células se lavaron con PBS, se cubrieron con cubreobjetos, y se detectó inmunofluorescencia usando un microscopio de fluorescencia invertido.

50 Los resultados se muestran en la Figura 2. En comparación con las células de control, las células que expresan tanto PirB como LILRB2 muestran unión con MAG-Fc. En este ejemplo, las células que expresaban mSMAGP actuaron como un control positivo para la unión.

Ejemplo 4

55 PirB se expresa en el sistema nervioso

Para abordar si PirB se expresa o no en el sistema nervioso se realizó análisis de RT-PCR en ARNm aislado de diferentes tejidos neurales. Se diseccionaron cerebelo P7, Ganglios de las Raíces Dorsales P10 (GRD), cerebro del adulto y bazo del adulto (control positivo) de ratones CD1 y se colocaron inmediatamente en RNAlater (Ambion), se extrajo ARNm usando el kit de aislamiento RNEasy (Qiagen). Se generó ADNc a partir de ARNm usando el sistema de Síntesis de Primera Cadena Superscript III de Invitrogen. Después se realizó RT-PCR usando los cebadores específicos para PirB 5'TGAAGGCTCTCATTGGAGTGTCTG3' (SEC ID N°: 20) y 5'GGCATAGGTCACATCCTGGGAC3' (SEC ID N°: 3), cebadores que reaccionan de forma cruzada con diferentes miembros de la subfamilia de PirA (5'GTCTCAGAAACCATTGAATCC3' (SEC ID N°: 4) y 5'GACAGAAAACCTTTGGGTCATCAG3' (SEC ID N°: 5)), o cebadores específicos para SMAGP de ratón (5'CCCTCAGCAACGATGAACAACC3' (SEC ID N°: 6) y 5'TGGACCCTGGAGTCAGTGATTC3' (SEC ID N°: 7)).

Como se muestra en la Figura 3, el análisis de RT-PCR reveló que las isoformas tanto PirB como PirA podían detectarse en cerebelo, GRD y cerebro.

Ejemplo 5

5

Resultados de la hibridación *in situ*

Para analizar la expresión neuronal de PirB en más detalle, se realizaron análisis de hibridación *in situ*. Se perfundieron ratones adultos o post natales, y después el cerebro y los GRD se diseccionaron y se postfijaron durante una noche. Los tejidos se crioprotegieron posteriormente en sacarosa al 30%, y se incluyeron y congelaron en compuesto de O.C.T (Tissue-Tek). Los tejidos congelados se seccionaron a un grosor de 12 micrómetros. Se prepararon sondas radiactivas usando el kit de transcripción *in vitro* MAXIscript (Ambion), siguiendo los protocolos de fabricante. Se llevó a cabo hibridación *in situ* usando el kit localizador de ARNm ISH (Ambion), de acuerdo con los protocolos del fabricante.

15

La sonda de PirB se diseñó para hibridar con los nucleótidos N° 1922-2385, que están en el dominio transmembrana e intracelular único de PirB. Los cebadores usados para amplificar esta región fueron 5'TGAAGGCTCTCATTGGAGTGTCTG3' (SEC ID N°: 8) y 5'GGCATAGGTCACATCCTGGGAC3' (SEC ID N°: 9). El fragmento de 464 pb se clonó en pCRII-TOPO (Invitrogen).

20

Los resultados de la hibridación *in situ* se muestran en las Figuras 4A-4C. Se ve señal de hibridación positiva en todo el córtex, en el hipocampo, en el cerebelo y en células de los GRD.

Ejemplo 6

25

Inhibición por Nogo66 del crecimiento de los axones y su rescate por PirB ECD en neuronas granulares cerebelares

En este experimento, se confirmó la capacidad de Nogo-66 para inhibir el crecimiento de los axones. Además, las construcciones de dominio extracelular de PirB se ensayaron con respecto a su capacidad para interferir en la actividad inhibitoria de Nogo-66.

30

AP-Nogo66 se generó clonando el bucle inhibidor de 66 aminoácidos de NogoA cadena abajo del gen de fosfatasa alcalina (AP) placentaria humana. La construcción se marcó con FLAG en el extremo N terminal para permitir la purificación, y se insertó en una cadena principal de vector pRK (Genentech). Para generar proteínas de dominio extracelular (ECD) de PirB, los aminoácidos N° 1- 638 de PirB se clonaron en vectores de expresión pRK cadena arriba de un marcador de 8-His (PirBHis) o Fc humano (PirBFc). Estas construcciones de expresión se transfectoron de forma transitoria en células CHO, y las proteínas secretadas se purificaron a partir del medio acondicionado por cromatografía de afinidad.

35

Se aislaron neuronas granulares cerebelares (CGN) de ratones P7 CD1, y se cultivaron en proteína AP-Nogo66 inmovilizada para ensayos de inhibición. Brevemente, se aplicaron puntualmente en placas de 96 pocillos previamente recubiertas con poli-D-lisina (Biocoat, Becton Dickinson) AP-Nogo66 recombinante (180 o 300 ng/3 µl por punto). La AP-Nogo66 se aplicó sola, o se mezcló con un exceso de PirBFc (850 ng/3 µl por punto) o PirBHis (1000 ng/3 µl por punto). Esto dio como resultado puntualmente se contenían un exceso molar de 2-4 veces de PirB ECD. Se permitió que las proteínas aplicadas puntualmente se adhirieran durante 2 horas, y después las placas se trataron con laminina 10 µg/ml (Invitrogen) durante 2 horas. Las células cerebelares P7 de ratón se prepararon como se ha descrito (Zheng *et al.*, 2005) y se sembraron en placas a una densidad de 2 X 10⁴ células/pocillo. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 22 horas, se fijaron con paraformaldehído 4%/sacarosa 4%, y se tiñeron con un anticuerpo antitubulina (TuJ1, Covance). Las imágenes se capturaron con el sistema de captura de imágenes ImageXpress (Molecular Devices).

50

Como se muestra en la Figura 6, AP-Nogo66 inhibe fuertemente la extensión de axones de neuronas cerebelares P7. La presencia de un exceso de PirB ECD, con PirBFc o PirBHis, redujo significativamente esta inhibición. La inclusión de otras proteínas de control (Fc o Robo4Fc) con AP-Nogo66 no redujo la inhibición.

55

Ejemplo 7

Co-inmunoprecipitación de PirB y NgR

Este experimento explora la relación e interacción potencial de PirB y NgR cuando se coexpresan en células hospedadoras *in vitro*.

60

Las células COS7 se transfectoron de forma transitoria con un vector de control, PirB de longitud completa, o una mezcla de PirB de longitud completa y NgR de longitud completa. 48 horas después de la transfección, las células se lisaron con Tampón de Lisis Celular (Cell Signaling Technology) y los lisados se inmunoprecipitaron con anti-PirA/B (6C1, Pharmingen). Las muestras se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se

65

exploraron con anti-NgR (Alpha Diagnostics International).

5 Como se muestra en la Figura 7, NgR se coprecipitó de forma robusta con PirB (panel izquierdo). El panel derecho muestra proteína total de lisados celulares completos inmunotransferidos con anti-NgR. Las bandas múltiples (flechas) representan NgR procesado por glicosilación en diversos grados.

Ejemplo 8

Anticuerpos de PirB y su uso para interferir con la actividad inhibitoria del crecimiento de axones de Nogo66

10 En este experimento, se ensayaron anticuerpos contra PirB con respecto a su capacidad para interferir con inhibición inducida por Nogo-66 del crecimiento de los axones.

15 Se aislaron neuronas granulares cerebelares (CGN) de ratones P7 CD1 y se cultivaron en proteína AP-Nogo66 inmovilizada para ensayos de inhibición, como se ha descrito en los ejemplos previos. Se generaron anticuerpos de bloqueo de función explorando PirB ECD frente a una biblioteca de fagos de anticuerpo sintético humano, esencialmente como se describe en Liang *et al.*, J. Mol. Biol. 366 (3): 815- 819 (2006). Los clones se seleccionaron con respecto a su capacidad para competir con la unión de AP-Nogo66 con PirB. En este experimento, se incubaron anticuerpos anti-PirB o de control con neuronas cultivadas en AP-Nogo66. Como se muestra en la Figura 8, los anticuerpos anti-PirB condujeron a una reducción significativa en la inhibición por AP-Nogo66.

20 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que se considera que son las realizaciones específicas, debe entenderse que la invención no se limita a dichas realizaciones. Por el contrario, la invención pretende abarcar diversas modificaciones y equivalentes incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Genentech, Inc.
Atwal, Jasvinder
Tessier-Lavigne

<120> MODULADORES DE LA REGENERACIÓN NEURONAL

35 <130> 39766-0209.PCT

<140> Todavía no se ha asignado
<141> Adjunto

40 <150> 60/865.772
<151> 14-11-2006

45 <150> 60/890.416
<151> 16-02-2007

<160> 20

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

50 <210> 1
<211> 841
<212> PRT
<213> *Mus Musculus*

55 <400> 1

ES 2 437 110 T3

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

210						215						220					
Lys	Pro	Thr	Ile	Lys	Ala	Glu	Pro	Gly	Pro	Val	Ile	Ala	Ser	Lys	Arg		
225					230					235					240		
Ala	Met	Thr	Ile	Trp	Cys	Gln	Gly	Asn	Leu	Asp	Ala	Glu	Val	Tyr	Phe		
				245					250					255			
Leu	His	Asn	Glu	Gly	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Thr	Leu	Gln		
			260					265					270				
Gln	Pro	Gly	Asn	Lys	Gly	Lys	Phe	Phe	Ile	Pro	Ser	Met	Thr	Arg	Gln		
		275					280					285					
His	Ala	Gly	Gln	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Cys	Tyr	Gly	Ser	Ala	Gly	Trp	Ser		
	290					295				300							
Gln	Pro	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Ile	Tyr	Glu	His		
305					310					315					320		
Tyr	Lys	Pro	Arg	Leu	Ser	Val	Leu	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Thr	Ala	Gly		
				325					330					335			
Gly	Asn	Met	Thr	Leu	His	Cys	Ala	Ser	Asp	Phe	His	Tyr	Asp	Lys	Phe		
			340					345					350				
Ile	Leu	Thr	Lys	Glu	Asp	Lys	Lys	Phe	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp	Thr	Glu		
		355					360					365					
His	Ile	Ser	Ser	Ser	Arg	Gln	Tyr	Arg	Ala	Leu	Phe	Ile	Ile	Gly	Pro		
	370					375					380						
Thr	Thr	Pro	Thr	His	Thr	Gly	Thr	Phe	Arg	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Lys		
385					390					395					400		
Asn	Ala	Pro	Gln	Leu	Trp	Ser	Val	Pro	Ser	Asp	Leu	Gln	Gln	Ile	Leu		
				405					410					415			
Ile	Ser	Gly	Leu	Ser	Lys	Lys	Pro	Ser	Leu	Leu	Thr	His	Gln	Gly	His		
			420					425					430				
Ile	Leu	Asp	Pro	Gly	Met	Thr	Leu	Thr	Leu	Gln	Cys	Tyr	Ser	Asp	Ile		
		435					440					445					
Asn	Tyr	Asp	Arg	Phe	Ala	Leu	His	Lys	Val	Gly	Gly	Ala	Asp	Ile	Met		
	450					455				460							
Gln	His	Ser	Ser	Gln	Gln	Thr	Asp	Thr	Gly	Phe	Ser	Val	Ala	Asn	Phe		
465					470					475					480		
Thr	Leu	Gly	Tyr	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Gln	Tyr	Arg	Cys	Tyr		
				485					490					495			
Gly	Ala	His	Asn	Leu	Ser	Ser	Glu	Trp	Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	Pro	Leu		
			500					505					510				
Asp	Ile	Leu	Ile	Thr	Gly	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Leu	Ser	Val		
		515					520					525					
Lys	Pro	Asn	His	Thr	Val	His	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Ser	Leu	Leu	Cys		
	530					535					540						
Trp	Ser	Met	Asp	Ser	Val	Asp	Thr	Phe	Ile	Leu	Ser	Lys	Glu	Gly	Ser		
545					550					555					560		
Ala	Gln	Gln	Pro	Leu	Arg	Leu	Lys	Ser	Lys	Ser	His	Asp	Gln	Gln	Ser		
				565					570					575			
Gln	Ala	Glu	Phe	Ser	Met	Ser	Ala	Val	Thr	Ser	His	Leu	Ser	Gly	Thr		
			580					585					590				
Tyr	Arg	Cys	Tyr	Gly	Ala	Gln	Asn	Ser	Ser	Phe	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ser		
		595					600					605					
Ala	Ser	Ala	Pro	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Pro	Ile	Glu	Thr	Ser		
	610					615					620						
Thr	Pro	Pro	Pro	Thr	Met	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Gly	Leu	His	Met	Tyr		
625					630					635					640		
Leu	Lys	Ala	Leu	Ile	Gly	Val	Ser	Val	Ala	Phe	Ile	Leu	Phe	Leu	Phe		
				645					650					655			
Ile	Leu	Ile	Phe	Ile	Leu	Leu	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Gly	Lys	Phe	Arg		
			660					665					670				
Lys	Asp	Val	Gln	Lys	Glu	Lys	Asp	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Gly	Ala	Glu		

		675					680					685			
Glu	Pro	Ile	Thr	Arg	Lys	Gly	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Pro	Asn	Pro	Ala
	690					695					700				
Ala	Ala	Thr	Gln	Glu	Glu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Val	Glu	Asp	Met	Gln
705					710					715					720
Thr	Glu	Asp	Gly	Val	Glu	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Pro	Pro	Glu	Glu	Asp
				725					730					735	
Pro	Gln	Gly	Glu	Thr	Tyr	Ala	Gln	Val	Lys	Pro	Ser	Arg	Leu	Arg	Lys
			740					745					750		
Ala	Gly	His	Val	Ser	Pro	Ser	Val	Met	Ser	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Thr
		755					760					765			
Glu	Tyr	Glu	Gln	Ala	Glu	Glu	Gly	Gln	Gly	Ala	Asn	Asn	Gln	Ala	Ala
770						775					780				
Glu	Ser	Gly	Glu	Ser	Gln	Asp	Val	Thr	Tyr	Ala	Gln	Leu	Cys	Ser	Arg
785					790					795					800
Thr	Leu	Arg	Gln	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Leu	Ser	Gln	Ala	Gly	Glu
			805						810					815	
Ala	Pro	Glu	Glu	Pro	Ser	Val	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro
			820					825					830		
Glu	Ala	Val	Pro	Lys	Asp	Val	Glu	Gln							
		835					840								

<210> 2
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 2

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

10

225					230					235					240
Leu	Thr	Leu	Gln	Cys	Val	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Asp	Arg	Phe	Val	Leu
				245					250					255	
Tyr	Lys	Glu	Gly	Glu	Arg	Asp	Leu	Arg	Gln	Leu	Pro	Gly	Arg	Gln	Pro
			260					265					270		
Gln	Ala	Gly	Leu	Ser	Gln	Ala	Asn	Phe	Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Ser	Arg
		275					280					285			
Ser	Tyr	Gly	Gly	Gln	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asn	Leu	Ser	Ser
	290					295					300				
Glu	Trp	Ser	Ala	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Asp	Ile	Leu	Ile	Thr	Gly	Gln
305						310				315					320
Ile	His	Gly	Thr	Pro	Phe	Ile	Ser	Val	Gln	Pro	Gly	Pro	Thr	Val	Ala
				325					330					335	
Ser	Gly	Glu	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Cys	Gln	Ser	Trp	Arg	Gln	Phe	His
			340					345					350		
Thr	Phe	Leu	Leu	Thr	Lys	Ala	Gly	Ala	Ala	Asp	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu
		355					360					365			
Arg	Ser	Ile	His	Glu	Tyr	Pro	Lys	Tyr	Gln	Ala	Glu	Phe	Pro	Met	Ser
	370					375					380				
Pro	Val	Thr	Ser	Ala	His	Ala	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Gly	Ser	Leu
385					390					395					400
Asn	Ser	Asp	Pro	Tyr	Leu	Leu	Ser	His	Pro	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Leu
				405					410					415	
Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ser	Met	Gly	Ser	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	Gly	Pro
			420					425					430		
Ile	Ser	Thr	Pro	Ala	Gly	Pro	Glu	Asp	Gln	Pro	Leu	Thr	Pro	Thr	Gly
		435					440					445			
Ser	Asp	Pro	Gln	Ser	Gly	Leu	Gly	Arg	His	Leu	Gly	Val	Val	Ile	Gly
	450					455					460				
Ile	Leu	Val	Ala	Val	Val	Leu	Phe								
465					470				475						480
Leu	Ile	Leu	Arg	His	Arg	Arg	Gln	Gly	Lys	His	Trp	Thr	Ser	Thr	Gln
				485					490					495	
Arg	Lys	Ala	Asp	Phe	Gln	His	Pro	Ala	Gly	Ala	Val	Gly	Pro	Glu	Pro
			500					505					510		
Thr	Asp	Arg	Gly	Leu	Gln	Trp	Arg	Ser	Ser	Pro	Ala	Ala	Asp	Ala	Gln
	515						520						525		
Glu	Glu	Asn	Leu	Tyr	Ala	Ala	Val	Lys	Asp	Thr	Gln	Pro	Glu	Asp	Gly
	530					535					540				
Val	Glu	Met	Asp	Thr	Arg	Ala	Ala	Ala	Ser	Glu	Ala	Pro	Gln	Asp	Val
545					550					555					560
Thr	Tyr	Ala	Gln	Leu	His	Ser	Leu	Thr	Leu	Arg	Arg	Lys	Ala	Thr	Glu
				565					570					575	
Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Arg	Glu	Pro	Pro	Ala	Glu	Pro	Ser	Ile	Tyr
			580				585						590		
Ala	Thr	Leu	Ala	Ile	His										
		595													

<210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador

10

<400> 3
 ggcataggtc acatcctggg ac 22

15

<210> 4
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 4
 gtctcagaaa ccattgaatc c 21
 <210> 5
 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 5
 gacagaaaac ttgggtcat cag 23
 20 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 30 ccctcagcaa cgatgaacaa cc 22
 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7
 40 tggaccctgg agtcagtgat tc 22
 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 50 tgaaggctct cattggagtg tctg 24
 <210> 9
 <211> 22
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 9
 ggcataggtc acatcctggg ac 22
 <210> 10
 65 <211> 650
 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 10

```

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

```

Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met
 340 345 350
 Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg
 355 360 365
 Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met
 370 375 380
 Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser
 385 390 395 400
 Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu
 405 410 415
 Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly
 420 425 430
 Pro Thr Ser Thr Ser Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly
 435 440 445
 Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly
 450 455 460
 Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe
 465 470 475 480
 Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln
 485 490 495
 Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro
 500 505 510
 Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln
 515 520 525
 Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp Gly
 530 535 540
 Val Glu Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val
 545 550 555 560
 Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser
 565 570 575
 Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln
 580 585 590
 Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ala
 595 600 605
 Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg
 610 615 620
 Glu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala Val
 625 630 635 640
 Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
 645 650

<210> 11
 <211> 652
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 11

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

10

Gly Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr
 85 90 95
 Arg Cys Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Ala Gly Arg Ser Glu Ser Ser Asp
 100 105 110
 Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ile Lys Pro Thr Leu Ser
 115 120 125
 Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Asn Ser Gly Gly Asn Val Ile Leu Gln
 130 135 140
 Cys Asp Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ser Leu Cys Lys Glu Gly
 145 150 155 160
 Glu Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly
 165 170 175
 Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg
 180 185 190
 Trp Trp Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Glu Trp
 195 200 205
 Ser Leu Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Leu Gly Val Ser Lys
 210 215 220
 Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Ile Val Ala Pro Glu Glu
 225 230 235 240
 Thr Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ala Gly Tyr Asn Arg Phe Val
 245 250 255
 Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Leu Ala Gly Ala Gln
 260 265 270
 Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser
 275 280 285
 Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser
 290 295 300
 Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly
 305 310 315 320
 Gln Phe Tyr Asp Arg Val Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val
 325 330 335
 Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met
 340 345 350
 Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg
 355 360 365
 Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met
 370 375 380
 Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser
 385 390 395 400
 Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu
 405 410 415
 Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly
 420 425 430
 Pro Thr Ser Thr Ser Ala Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr
 435 440 445
 Gly Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile
 450 455 460
 Gly Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 465 470 475 480
 Phe Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr
 485 490 495
 Gln Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu
 500 505 510
 Pro Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala
 515 520 525
 Gln Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp
 530 535 540

Gly Val Glu Met Asp Thr Arg Gln Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln
 545 550 555 560
 Ala Val Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met
 565 570 575
 Ala Ser Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp
 580 585 590
 Arg Gln Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ser
 595 600 605
 Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu
 610 615 620
 Arg Arg Glu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro
 625 630 635 640
 Ala Val Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
 645 650

<210> 12
 <211> 651
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 12

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

10

Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser
 290 295 300
 Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly
 305 310 315 320
 Gln Phe Tyr Asp Arg Val Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val
 325 330 335
 Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met
 340 345 350
 Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg
 355 360 365
 Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met
 370 375 380
 Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser
 385 390 395 400
 Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu
 405 410 415
 Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly
 420 425 430
 Pro Thr Ser Thr Ser Ala Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr
 435 440 445
 Gly Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile
 450 455 460
 Gly Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 465 470 475 480
 Phe Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr
 485 490 495
 Gln Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu
 500 505 510
 Pro Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala
 515 520 525
 Gln Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp
 530 535 540
 Gly Val Glu Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala
 545 550 555 560
 Val Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala
 565 570 575
 Ser Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg
 580 585 590
 Gln Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu
 595 600 605
 Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg
 610 615 620
 Arg Glu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala
 625 630 635 640
 Val Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
 645 650

<210> 13
 <211> 651
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<400> 13

Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp
 20 25 30

5

10

Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg
35 40 45
Cys Gln Gly Gly Gln Glu Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys
50 55 60
Lys Thr Ala Leu Trp Ile Thr Arg Ile Pro Gln Glu Leu Val Lys Lys
65 70 75 80
Gly Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr
85 90 95
Arg Cys Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Ala Gly Arg Ser Glu Ser Ser Asp
100 105 110
Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ile Lys Pro Thr Leu Ser
115 120 125
Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Asn Ser Gly Gly Asn Val Ile Leu Gln
130 135 140
Cys Asp Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ser Leu Cys Lys Glu Gly
145 150 155 160
Glu Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly
165 170 175
Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg
180 185 190
Trp Trp Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Glu Trp
195 200 205
Ser Leu Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Leu Gly Val Ser Lys
210 215 220
Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Ile Val Ala Pro Glu Glu
225 230 235 240
Thr Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ala Gly Tyr Asn Arg Phe Val
245 250 255
Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Leu Ala Gly Ala Gln
260 265 270
Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser
275 280 285
Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser
290 295 300
Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly
305 310 315 320
Gln Phe Tyr Asp Arg Val Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val
325 330 335
Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met
340 345 350
Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg
355 360 365
Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met
370 375 380
Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser
385 390 395 400
Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu
405 410 415
Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly
420 425 430
Pro Thr Ser Thr Ser Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly
435 440 445
Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly
450 455 460
Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe
465 470 475 480
Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln
485 490 495

```

Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro
      500                               505                               510
Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln
      515                               520                               525
Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp Gly
      530                               535                               540
Val Glu Met Asp Thr Arg Gln Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala
545                               550                               555                               560
Val Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala
      565                               570                               575
Ser Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg
      580                               585                               590
Gln Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu
      595                               600                               605
Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg
610                               615                               620
Arg Glu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala
625                               630                               635                               640
Val Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
      645                               650

```

<210> 14
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 14

```

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

```

10

Leu Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro
 260 265 270
 Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg
 275 280 285
 Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser
 290 295 300
 Glu Cys Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln
 305 310 315 320
 Ile Arg Gly Thr Pro Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala
 325 330 335
 Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His
 340 345 350
 Thr Phe Leu Leu Thr Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu
 355 360 365
 Arg Ser Ile His Glu Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser
 370 375 380
 Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu
 385 390 395 400
 Asn Ser Asp Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu
 405 410 415
 Val Val Ser Gly Pro Ser Met Gly Ser Ser Pro Pro Pro Thr Gly Pro
 420 425 430
 Ile Ser Thr Pro Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly Ser
 435 440 445
 Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly Ile
 450 455 460
 Leu Val Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu
 465 470 475 480
 Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln Arg
 485 490 495
 Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro Thr
 500 505 510
 Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln Glu
 515 520 525
 Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Pro Glu Asp Gly Val
 530 535 540
 Glu Met Asp Thr Arg Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr
 545 550 555 560
 Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys Ala Thr Glu Pro
 565 570 575
 Pro Pro Ser Gln Glu Arg Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile Tyr Ala
 580 585 590
 Thr Leu Ala Ile His
 595

<210> 15
 <211> 632
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<400> 15

Met Thr Pro Ala Leu Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Gly Pro Phe Pro Lys Pro Thr Leu Trp
 20 25 30

5

10

Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Ser Pro Val Thr Ile Trp
35 40 45
Cys Gln Gly Ser Gln Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu His Lys Glu Gly
50 55 60
Ser Pro Glu Pro Leu Asp Arg Asn Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys
65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu His His Ala Gly Arg Tyr
85 90 95
Arg Cys His Tyr Tyr Ser Ser Ala Gly Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro
100 105 110
Leu Glu Met Val Met Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala
115 120 125
Leu Pro Ser Pro Val Val Ala Ser Gly Gly Asn Met Thr Leu Arg Cys
130 135 140
Gly Ser Gln Lys Gly Tyr His His Phe Val Leu Met Lys Glu Gly Glu
145 150 155 160
His Gln Leu Pro Arg Thr Leu Asp Ser Gln Gln Leu His Ser Arg Gly
165 170 175
Phe Gln Ala Leu Phe Pro Val Gly Pro Val Thr Pro Ser His Arg Trp
180 185 190
Arg Phe Thr Cys Tyr Tyr Tyr Tyr Thr Asn Thr Pro Trp Val Trp Ser
195 200 205
His Pro Ser Asp Pro Leu Glu Ile Leu Pro Ser Gly Val Ser Arg Lys
210 215 220
Pro Ser Leu Leu Thr Leu Gln Gly Pro Val Leu Ala Pro Gly Gln Ser
225 230 235 240
Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Val Gly Tyr Asn Arg Phe Val Leu
245 250 255
Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Gln Pro
260 265 270
Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro
275 280 285
Ser Asn Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser
290 295 300
Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asn Ile Leu Met Ala Gly Gln
305 310 315 320
Ile Tyr Asp Thr Val Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala
325 330 335
Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Trp Gln Phe Asp
340 345 350
Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His Pro Pro Leu Arg Leu
355 360 365
Arg Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser
370 375 380
Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Tyr
385 390 395 400
Ser Ser Asn Pro His Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu
405 410 415
Val Val Ser Gly His Ser Gly Gly Ser Ser Leu Pro Pro Thr Gly Pro
420 425 430
Pro Ser Thr Pro Gly Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Val Leu Ile Gly Val
435 440 445
Ser Val Ala Phe Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu
450 455 460
Arg Arg Gln Arg His Ser Lys His Arg Thr Ser Asp Gln Arg Lys Thr
465 470 475 480
Asp Phe Gln Arg Pro Ala Gly Ala Ala Glu Thr Glu Pro Lys Asp Arg
485 490 495

Gly Leu Leu Arg Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Val Gln Glu Glu Asn
 500 505 510
 Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Ser Glu Asp Arg Val Glu Leu
 515 520 525
 Asp Ser Gln Gln Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr
 530 535 540
 Ala Pro Val Lys His Ser Ser Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro
 545 550 555 560
 Ser Ser Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln Val Glu
 565 570 575
 Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ala Ser Gln
 580 585 590
 Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys Ala
 595 600 605
 Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser
 610 615 620
 Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
 625 630

<210> 16
 <211> 631
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 16

Met Thr Pro Ala Leu Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Gly Pro Phe Pro Lys Pro Thr Leu Trp
 20 25 30
 Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Ser Pro Val Thr Ile Trp
 35 40 45
 Cys Gln Gly Ser Gln Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu His Lys Glu Gly
 50 55 60
 Ser Pro Glu Pro Leu Asp Arg Asn Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys
 65 70 75 80
 Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu His His Ala Gly Arg Tyr
 85 90 95
 Arg Cys His Tyr Tyr Ser Ser Ala Gly Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro
 100 105 110
 Leu Glu Met Val Met Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala
 115 120 125
 Leu Pro Ser Pro Val Val Ala Ser Gly Gly Asn Met Thr Leu Arg Cys
 130 135 140
 Gly Ser Gln Lys Gly Tyr His His Phe Val Leu Met Lys Glu Gly Glu
 145 150 155 160
 His Gln Leu Pro Arg Thr Leu Asp Ser Gln Gln Leu His Ser Arg Gly
 165 170 175
 Phe Gln Ala Leu Phe Pro Val Gly Pro Val Thr Pro Ser His Arg Trp
 180 185 190
 Arg Phe Thr Cys Tyr Tyr Tyr Tyr Thr Asn Thr Pro Trp Val Trp Ser
 195 200 205
 His Pro Ser Asp Pro Leu Glu Ile Leu Pro Ser Gly Val Ser Arg Lys
 210 215 220
 Pro Ser Leu Leu Thr Leu Gln Gly Pro Val Leu Ala Pro Gly Gln Ser
 225 230 235 240
 Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Val Gly Tyr Asn Arg Phe Val Leu
 245 250 255

10

Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Gln Pro
 260 265 270
 Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro
 275 280 285
 Ser Asn Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser
 290 295 300
 Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asn Ile Leu Met Ala Gly Gln
 305 310 315 320
 Ile Tyr Asp Thr Val Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala
 325 330 335
 Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Trp Gln Phe Asp
 340 345 350
 Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His Pro Pro Leu Arg Leu
 355 360 365
 Arg Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser
 370 375 380
 Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Tyr
 385 390 395 400
 Ser Ser Asn Pro His Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu
 405 410 415
 Val Val Ser Gly His Ser Gly Gly Ser Ser Leu Pro Pro Thr Gly Pro
 420 425 430
 Pro Ser Thr Pro Gly Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Val Leu Ile Gly Val
 435 440 445
 Ser Val Ala Phe Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 450 455 460
 Arg Arg Gln Arg His Ser Lys His Arg Thr Ser Asp Gln Arg Lys Thr
 465 470 475 480
 Asp Phe Gln Arg Pro Ala Gly Ala Ala Glu Thr Glu Pro Lys Asp Arg
 485 490 495
 Gly Leu Leu Arg Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Val Gln Glu Glu Asn
 500 505 510
 Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Ser Glu Asp Arg Val Glu Leu
 515 520 525
 Asp Ser Gln Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr Ala
 530 535 540
 Pro Val Lys His Ser Ser Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro Ser
 545 550 555 560
 Ser Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln Val Glu Glu
 565 570 575
 Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ser Glu Ala Ser Gln Asp
 580 585 590
 Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys Ala Thr
 595 600 605
 Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile
 610 615 620
 Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
 625 630

<210> 17
 <211> 591
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<400> 17

Met Thr Leu Thr Leu Ser Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Val Gly
 1 5 10 15

5

10

Pro Arg Thr Cys Val Gln Ala Gly Thr Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp
 20 25 30
 Ala Glu Pro Ala Ser Val Ile Ala Arg Gly Lys Pro Val Thr Leu Trp
 35 40 45
 Cys Gln Gly Pro Leu Glu Thr Glu Glu Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Gly
 50 55 60
 Leu Pro Trp Ala Arg Lys Arg Gln Asn Pro Leu Glu Pro Gly Ala Lys
 65 70 75 80
 Ala Lys Phe His Ile Pro Ser Thr Val Tyr Asp Ser Ala Gly Arg Tyr
 85 90 95
 Arg Cys Tyr Tyr Glu Thr Pro Ala Gly Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro
 100 105 110
 Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Phe Tyr Ala Glu Pro Thr Leu Leu Ala
 115 120 125
 Leu Pro Ser Pro Val Val Ala Ser Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys
 130 135 140
 Asp Thr Leu Asp Gly Leu Leu Thr Phe Val Leu Val Glu Glu Glu Gln
 145 150 155 160
 Lys Leu Pro Arg Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Leu Pro Lys Gly Pro Ser
 165 170 175
 Gln Ala Leu Phe Pro Val Gly Pro Val Thr Pro Ser Cys Arg Trp Arg
 180 185 190
 Phe Arg Cys Tyr Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn Pro Gln Val Trp Ser Asn
 195 200 205
 Pro Ser Asp Leu Leu Glu Ile Leu Val Pro Gly Val Ser Arg Lys Pro
 210 215 220
 Ser Leu Leu Ile Pro Gln Gly Ser Val Val Ala Arg Gly Gly Ser Leu
 225 230 235 240
 Thr Leu Gln Cys Arg Ser Asp Val Gly Tyr Asp Ile Phe Val Leu Tyr
 245 250 255
 Lys Glu Gly Glu His Asp Leu Val Gln Gly Ser Gly Gln Gln Pro Gln
 260 265 270
 Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser
 275 280 285
 His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Pro Arg
 290 295 300
 Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly Leu Ile
 305 310 315 320
 Pro Asp Ile Pro Ala Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Lys Val Ala Ser
 325 330 335
 Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp His Gln Ile Asp Thr
 340 345 350
 Phe Phe Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His Pro Pro Leu Cys Leu Lys
 355 360 365
 Ser Lys Tyr Gln Ser Tyr Arg His Gln Ala Glu Phe Ser Met Ser Pro
 370 375 380
 Val Thr Ser Ala Gln Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala Ile Arg
 385 390 395 400
 Ser Tyr Pro Tyr Leu Leu Ser Ser Pro Ser Tyr Pro Gln Glu Leu Val
 405 410 415
 Val Ser Gly Pro Ser Gly Asp Pro Ser Leu Ser Pro Thr Gly Ser Thr
 420 425 430
 Pro Thr Pro Ala Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly Leu
 435 440 445
 Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Thr Gly Val
 450 455 460
 Ser Val Ala Phe Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 465 470 475 480

Arg His Arg His Gln Ser Lys His Arg Thr Ser Ala His Phe Tyr Arg
 485 490 495
 Pro Ala Gly Ala Ala Gly Pro Glu Pro Lys Asp Gln Gly Leu Gln Lys
 500 505 510
 Arg Ala Ser Pro Val Ala Asp Ile Gln Glu Glu Ile Leu Asn Ala Ala
 515 520 525
 Val Lys Asp Thr Gln Pro Lys Asp Gly Val Glu Met Asp Ala Arg Ala
 530 535 540
 Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser
 545 550 555 560
 Leu Thr Leu Arg Arg Glu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Arg
 565 570 575
 Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile Tyr Ala Pro Leu Ala Ile His
 580 585 590

<210> 18
 <211> 590
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 18

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

10

His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Pro Arg
 290 295 300
 Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly Leu Ile
 305 310 315 320
 Pro Asp Ile Pro Ala Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Lys Val Ala Ser
 325 330 335
 Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp His Gln Ile Asp Thr
 340 345 350
 Phe Phe Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His Pro Pro Leu Cys Leu Lys
 355 360 365
 Ser Lys Tyr Gln Ser Tyr Arg His Gln Ala Glu Phe Ser Met Ser Pro
 370 375 380
 Val Thr Ser Ala Gln Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala Ile Arg
 385 390 395 400
 Ser Tyr Pro Tyr Leu Leu Ser Ser Pro Ser Tyr Pro Gln Glu Leu Val
 405 410 415
 Val Ser Gly Pro Ser Gly Asp Pro Ser Leu Ser Pro Thr Gly Ser Thr
 420 425 430
 Pro Thr Pro Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly Leu Asp
 435 440 445
 Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Thr Gly Val Ser
 450 455 460
 Val Ala Phe Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Leu Leu Arg
 465 470 475 480
 His Arg His Gln Ser Lys His Arg Thr Ser Ala His Phe Tyr Arg Pro
 485 490 495
 Ala Gly Ala Ala Gly Pro Glu Pro Lys Asp Gln Gly Leu Gln Lys Arg
 500 505 510
 Ala Ser Pro Val Ala Asp Ile Gln Glu Glu Ile Leu Asn Ala Ala Val
 515 520 525
 Lys Asp Thr Gln Pro Lys Asp Gly Val Glu Met Asp Ala Arg Ala Ala
 530 535 540
 Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu
 545 550 555 560
 Thr Leu Arg Arg Glu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Arg Glu
 565 570 575
 Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile Tyr Ala Pro Leu Ala Ile His
 580 585 590

<210> 19
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 19

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

10

Arg Cys Tyr Tyr Glu Thr Pro Ala Gly Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro
 100 105 110
 Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Ser Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ile
 115 120 125
 Pro Gln Gly Ser Val Val Ala Arg Gly Gly Ser Leu Thr Leu Gln Cys
 130 135 140
 Arg Ser Asp Val Gly Tyr Asp Ile Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu
 145 150 155 160
 His Asp Leu Val Gln Gly Ser Gly Gln Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser
 165 170 175
 Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser His Gly Gly Gln
 180 185 190
 Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Pro Arg Trp Ser Ala Pro
 195 200 205
 Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly Leu Ile Pro Asp Ile Pro
 210 215 220
 Ala Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Lys Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
 225 230 235 240
 Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp His Gln Ile Asp Thr Phe Phe Leu Thr
 245 250 255
 Lys Glu Gly Ala Ala His Pro Pro Leu Cys Leu Lys Ser Lys Tyr Gln
 260 265 270
 Ser Tyr Arg His Gln Ala Glu Phe Ser Met Ser Pro Val Thr Ser Ala
 275 280 285
 Gln Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala Ile Arg Ser Tyr Pro Tyr
 290 295 300
 Leu Leu Ser Ser Pro Ser Tyr Pro Gln Glu Leu Val Val Ser Gly Pro
 305 310 315 320
 Ser Gly Asp Pro Ser Leu Ser Pro Thr Gly Ser Thr Pro Thr Pro Ala
 325 330 335
 Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly Leu Asp Pro Gln Ser
 340 345 350
 Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Thr Gly Val Ser Val Ala Phe
 355 360 365
 Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Arg His Arg His
 370 375 380
 Gln Ser Lys His Arg Thr Ser Ala His Phe Tyr Arg Pro Ala Gly Ala
 385 390 395 400
 Ala Gly Pro Glu Pro Lys Asp Gln Gly Leu Gln Lys Arg Ala Ser Pro
 405 410 415
 Val Ala Asp Ile Gln Glu Glu Ile Leu Asn Ala Ala Val Lys Asp Thr
 420 425 430
 Gln Pro Lys Asp Gly Val Glu Met Asp Ala Arg Ala Ala Ser Glu
 435 440 445
 Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg
 450 455 460
 Arg Glu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Arg Glu Pro Pro Ala
 465 470 475 480
 Glu Pro Ser Ile Tyr Ala Pro Leu Ala Ile His
 485 490

<210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador

10

<400> 20
 tgaaggctct cattggagtg tctg 24

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un antagonista de PirB/LILRB que comprende poner en contacto un agente candidato con un complejo que comprende PirB/LILRB y mielina o una proteína asociada a mielina, o un fragmento de la misma, y detectar la capacidad de dicho agente candidato para inhibir la interacción entre PirB/LILRB y dicha mielina o proteína asociada a mielina, o fragmento de la misma, en la que el agente candidato se identifica como un antagonista si se inhibe la interacción.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la interacción es unión o señalización celular, opcionalmente en el que dicha señalización celular da como resultado la inhibición de la extensión de los axones o de la regeneración neuronal.
3. El método de la reivindicación 1 en el que la proteína asociada a mielina se selecciona del grupo que consiste en Nogo, MAG y OMgp.
4. El método de la reivindicación 3 en el que dicho PirB/LILRB se selecciona del grupo que consiste en LILRB1, LILRB2, LILRB3 y LILRB5, opcionalmente en el que dicho PirB/LILRB se selecciona del grupo que consiste en LILRB2, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 2), LILRB2, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 14), LILRB1, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 10), LILRB1, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 11), LILRB1, variante de transcrito 3 (SEC ID N°: 12), LILRB1, variante de transcrito 4 (SEC ID N°: 13), LILRB3, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 15), LILRB3, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 16), LILRB5, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 17), LILRB5, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 18) y LILRB5, variante de transcrito 3 (SEC ID N°: 19), adicionalmente opcionalmente en el que dicho PirB es LILRB2, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 2) o LILRB2, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 14).
5. El método de la reivindicación 3 en el que el complejo comprende además NgR.
6. El método de la reivindicación 1 en el que el agente candidato se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, ARN de interferencia cortos (ARNip), moléculas orgánicas pequeñas, polisacáridos y polinucleótidos, opcionalmente en el que el agente candidato es un anticuerpo o un ARN de interferencia corto (ARNip).
7. El método de la reivindicación 6 en el que dicho anticuerpo se une específicamente a PirB/LILRB, opcionalmente en el que dicho anticuerpo se une específicamente a un LILRB2.
8. El método de la reivindicación 7 en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno, en el que dicho fragmento de anticuerpo se secciona opcionalmente del grupo que consiste en fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂.
9. El método de la reivindicación 1 en el que al menos uno de dicho PirB/LILRB y dicha mielina o proteína asociada a mielina, o fragmento de la misma, se inmoviliza.
10. El método de la reivindicación 1 que es un ensayo basado en células, opcionalmente en el que dicho ensayo basado en células comprende cultivar células neuronales con dicha mielina o proteína asociada a mielina, o fragmento de la misma, en presencia y ausencia de dicho agente candidato y determinar el cambio de la longitud de las neuritas, en el que dicho agente candidato se identifica como un antagonista cuando la longitud de la neurita es mayor en presencia de dicho agente candidato.
11. El método de la reivindicación 10 en el que dichas células neuronales son neuronas primarias o derivan de células o líneas de células madre embrionarias no humanas (ES), o en el que dichas células neuronales derivan de neuroblastoma, o se seleccionan del grupo que consiste en neuronas granulares cerebelares, neuronas de ganglios de las raíces dorsales y neuronas corticales.
12. Un método *in vitro* para potenciar la extensión de neuritas y/o promover el crecimiento, la reparación y/o la regeneración neuronales, comprendiendo el método identificar un antagonista de PirB/LILRB de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y usar el antagonista identificado para potenciar la extensión de neuritas y/o promover el crecimiento, la reparación y/o la regeneración neuronales, en el que el antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a PirB/LILRB.
13. Un antagonista de PirB/LILRB identificado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11 para uso en un método para tratar lesión neural en un sujeto, en el que el antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a PirB/LILRB.
14. Uso de un complejo de PirB/LILRB y mielina o una proteína asociada a mielina, o un fragmento de la misma, para identificar un antagonista de PirB/LILRB.

15. Uso de un antagonista de PirB/LILRB en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico, en el que el antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a PirB/LILRB e inhibe la interacción entre PirB/LILRB y mielina o una proteína asociada a mielina, o un fragmento de la misma.
- 5 16. Un antagonista de PirB/LILRB en el tratamiento de un trastorno neurológico, en el que el antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a PirB/LILRB e inhibe la interacción entre PirB/LILRB y mielina o una proteína asociada a mielina, o un fragmento de la misma.
- 10 17. El uso de acuerdo con la reivindicación 15 o antagonista de PirB/LILRB para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el tratamiento es curativo, profiláctico o preventivo.
- 15 18. El uso o antagonista de PirB/LILRB para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el trastorno neurológico se **caracteriza por** un nervio dañado físicamente o es una enfermedad neurodegenerativa.
- 15 19. El uso o antagonista de PirB/LILRB para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que el tratamiento es la prevención de neurodegeneración.
- 20 20. El uso o antagonista de PirB/LILRB para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en daño a los nervios periféricos provocado por lesión física o diabetes; daño físico al sistema nervioso central; daño cerebral asociado con ictus, neuralgia del trigémino, neuralgia glossofaríngea, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular progresiva, atrofia muscular heredada bulbar progresiva, síndromes de discos intervertebrales herniados, rotos y prolapsados, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de salida torácica, neuropatías periféricas, porfiria, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.
- 25 21. El uso o antagonista de PirB/LILRB para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que la interacción es unión o señalización celular, opcionalmente en el que dicha señalización celular da como resultado la inhibición de la extensión de los axones o de la regeneración neuronal.
- 30 22. El uso o antagonista de PirB/LILRB para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en el que la proteína asociada a mielina se selecciona del grupo que consiste en Nogo, MAG y OMgp.
- 35 23. El uso o antagonista de PirB/LILRB para uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dicho PirB/LILRB se selecciona del grupo que consiste en LILRB1, LILRB2, LILRB3 y LILRB5, opcionalmente en el que dicho PirB/LILRB se selecciona del grupo que consiste en LILRB2, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 2), LILRB2, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 14), LILRB1, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 10), LILRB1, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 11), LILRB1, variante de transcrito 3 (SEC ID N°: 12), LILRB1, variante de transcrito 4 (SEC ID N°: 13), LILRB3, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 15), LILRB3, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 16), LILRB5, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 17), LILRB5, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 18) y LILRB5, variante de transcrito 3 (SEC ID N°: 19), adicionalmente opcionalmente en el que dicho PirB es LILRB2, variante de transcrito 1 (SEC ID N°: 2) o LILRB2, variante de transcrito 2 (SEC ID N°: 14).
- 40

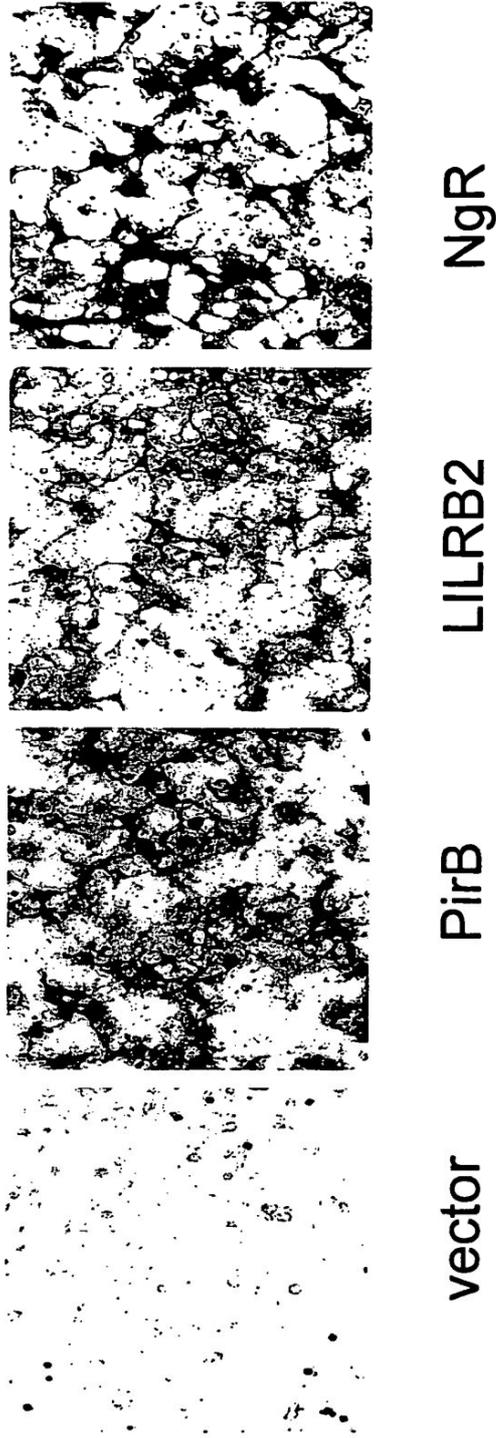


Figura 1

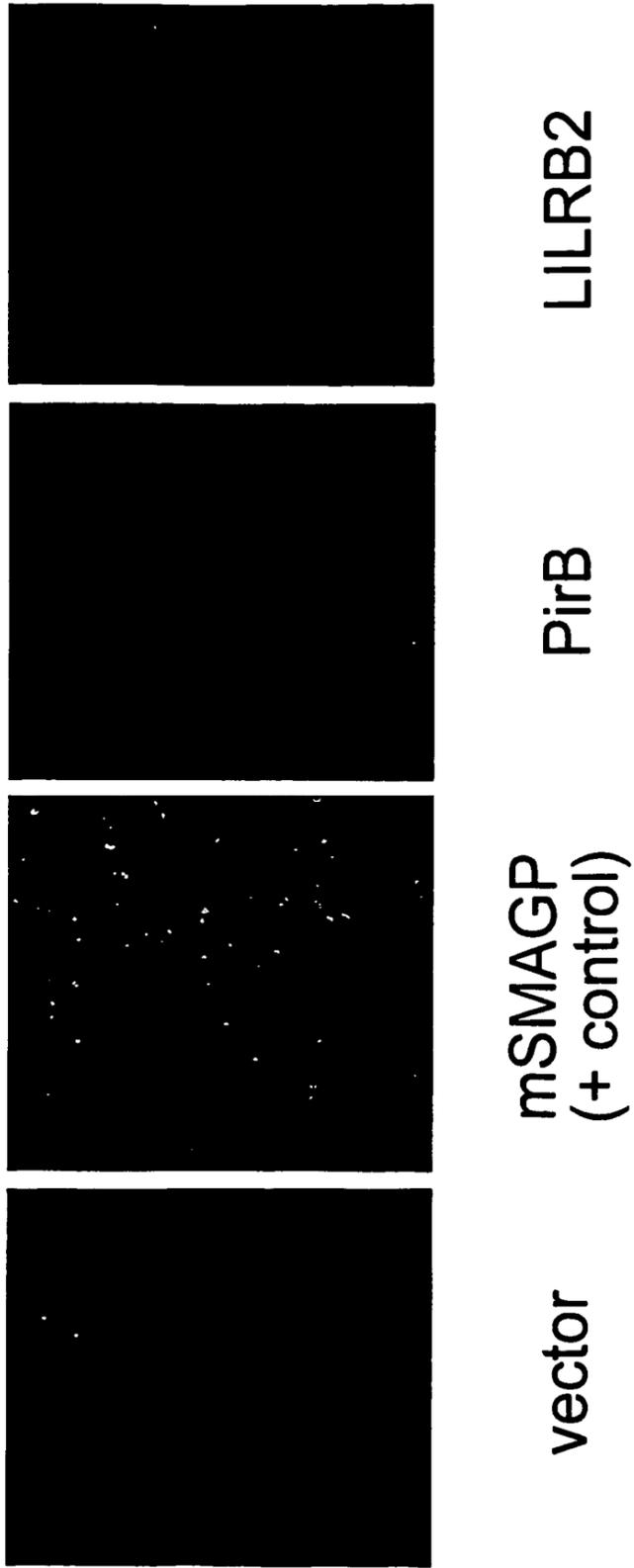


Figura 2

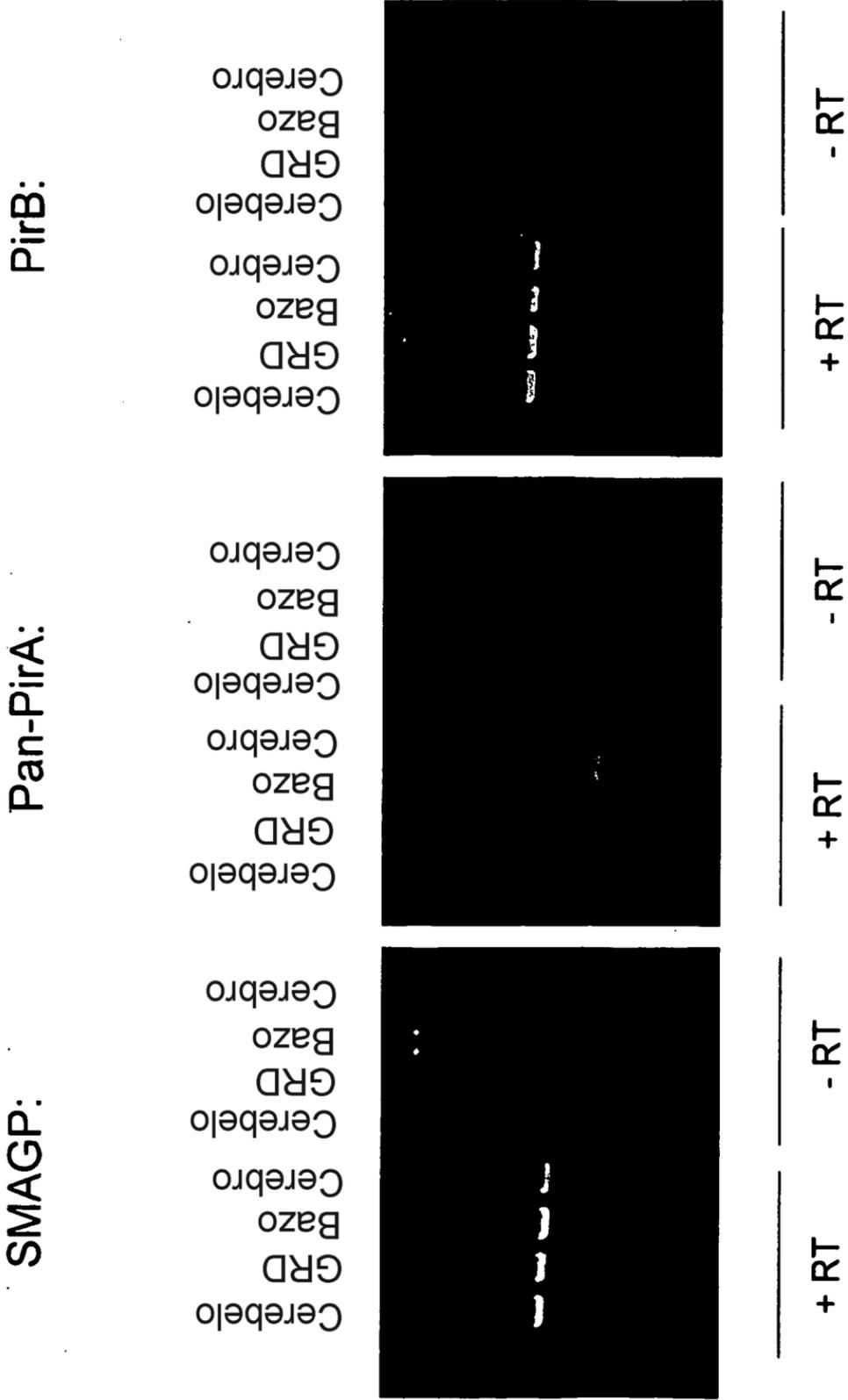


Figura 3

Hibridación *in situ* de PirB
(proencéfalo adulto)

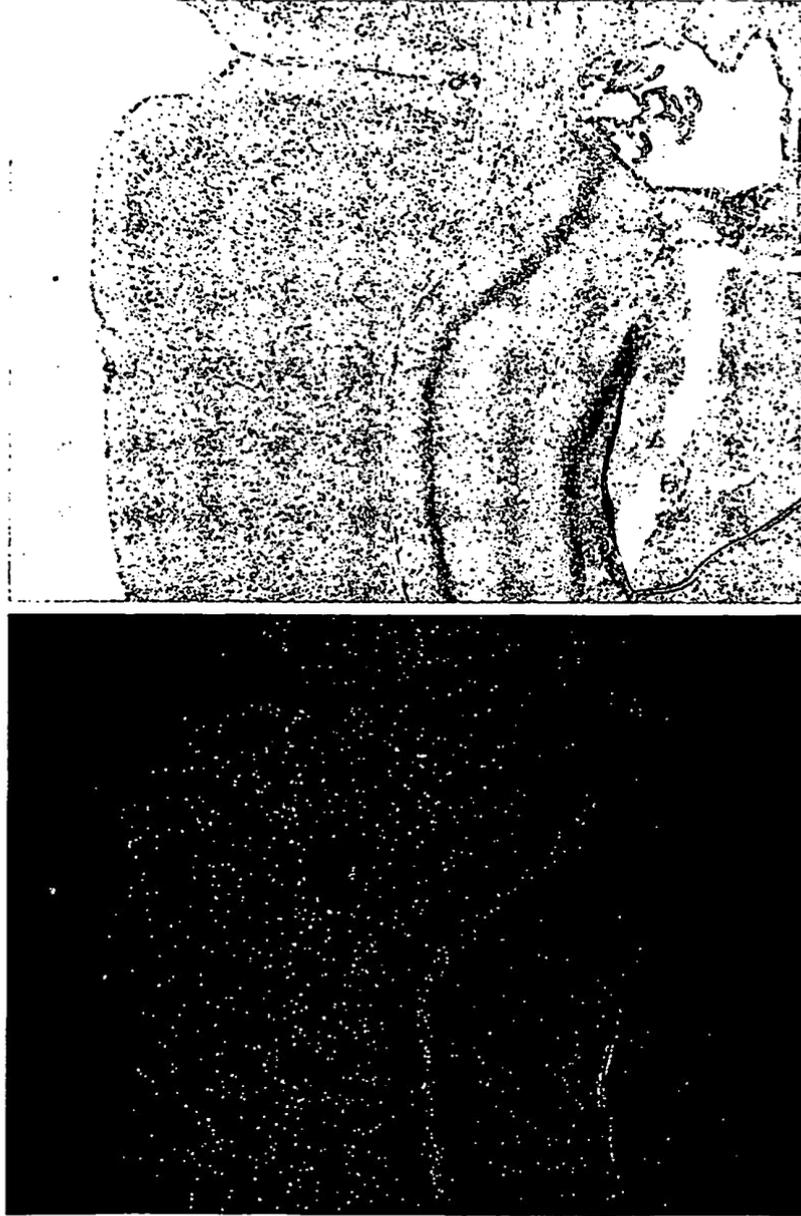


Figura 4A

Hibridación *in situ* de PirB
(Cerebelo adulto)

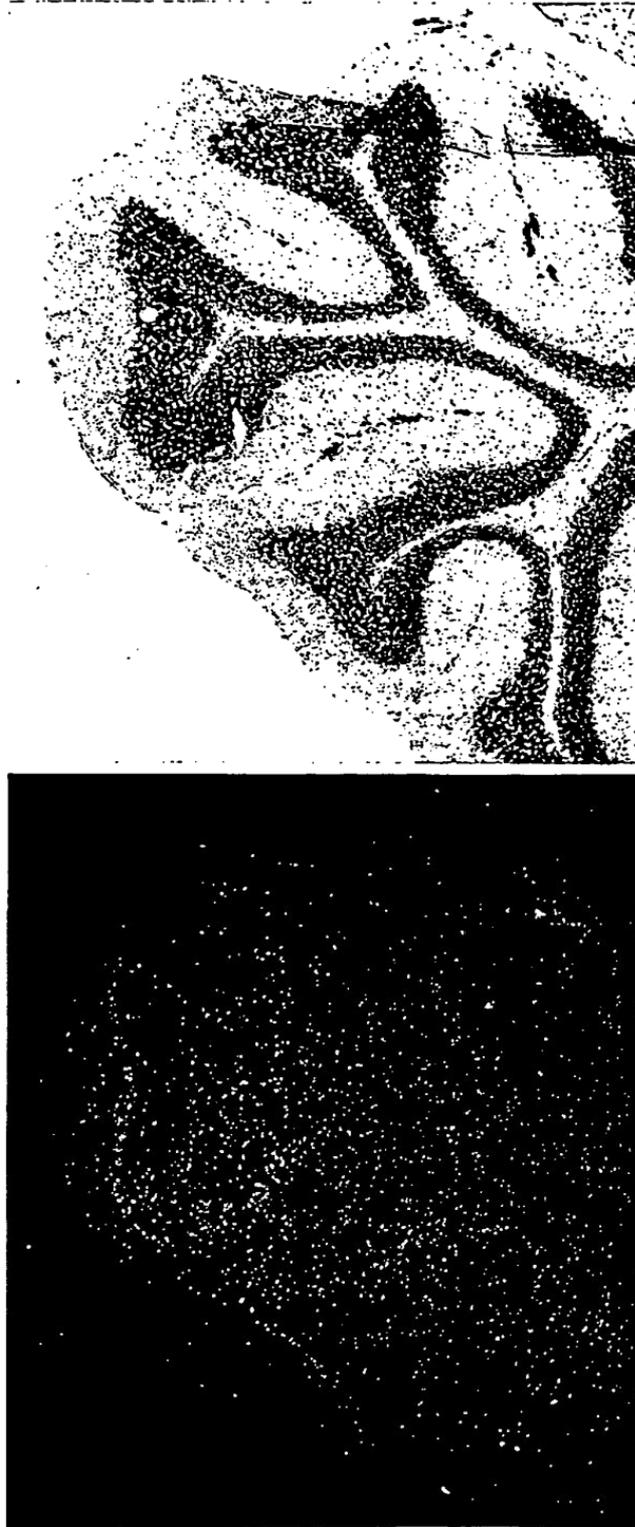


Figura 4B

Hibridación *in situ* de PirB
(Ganglio de la Raíz Dorsal P10)

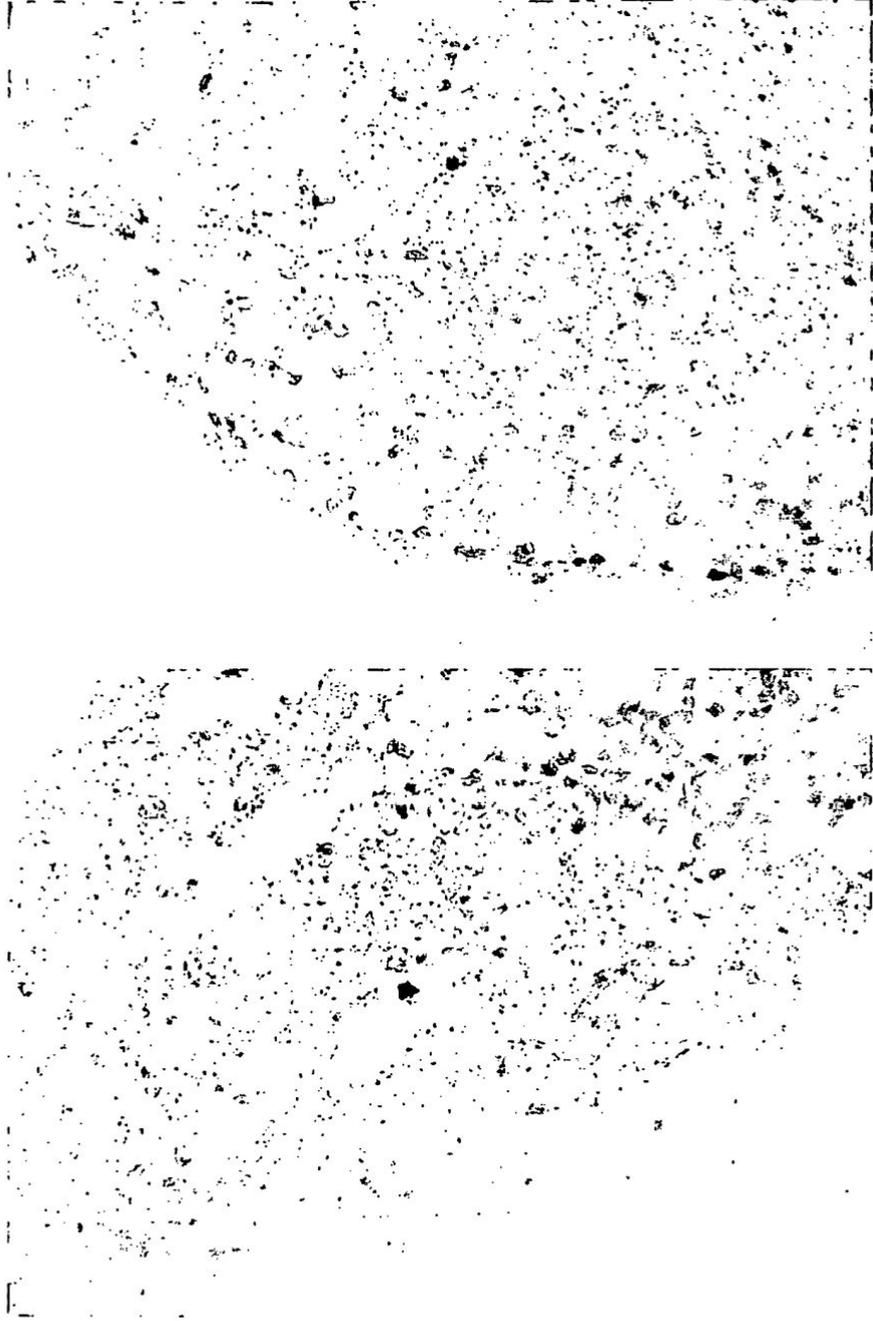


Figura 4C

FIG. 5

Secuencia de PirB (de ratón) (SEC ID N°: 1)

```

1 mscfttallr lgtlslwip vltgslpkpi lrvqpdsvs rwtkvtfce etiganeyrl
  61 ykdgklyktv tknkqkpank aefslsnvdl rnagqyrcsy stqyks'sgys dplslvvtgd
 121 ywtpslilaq spvvtsggyv tlqceswhnd hkfiltvegp qklswtqdsq ynystkyha
 181 lfsvgpvtpn qrwicrcysy drnrpyvwsp psesvellvs gnlqkptika epgpvlskr
 241 antiwcqgnl daevyflhne gsqktqstqt lqpgnkkgkf fipsmtrqha gqyrcygyg
 301 agwsqpsdtl elvvtgiyeh ykprlslvps pvvtaggnmt lhcasdfhyd kfiltkedkk
 361 fgnsldtehi sssrqyralf iigpttptht gtfrcygyfk napqlwsvps dlqqilisgl
 421 skkpsllthq ghildpgmtl tlqcyzdiny drfalhkvvg adimqhesqq tdtgfsvanf
 481 tlgvssstg gqyrcygahn lssewsasse pldilitgql pltpslsvkp nhtvhsgetv
 541 sllewsmdsv dtfilskegs aqqplrlkks shdqqsqaef smsavtshls gtyrcygaqn
 601 ssfyllsaas apveltvsqp ietstppptm smplgqlhmy lkalgvsva filflfilif
 661 iilrrhrqk frkdvqekd lqlssgaeep itrkgelqkr pnpaatqee slyasvedmq
 721 tedgvelnsw tppeedpqqe tyaqvkp'rl rkaghvsvps m'reqlntey eqaeegqgan
 781 nqaesgesq dvtyaqlcsr tlrqgaasp lsqageapee psvyatlaaa rpeavpkdve
 841 q

```

Secuencia de LILRB2 (humana) (SEC ID N°:2)

```

1 mtpivtvlic lglslgprth vqtgtipkpt lwaepdsvit qgspvtlscq gsl'eaqeyrl
  61 yrekksaswi trirpelvkn gqfhipsitw ehtgrygcqy yararwsels dplvlvmtga
 121 ypkptl'eaqp spvvtsggrv tlqcesqvaf ggfi'ckege dehpqclnsq phargssrai
 181 fevgpvs'pnr rwhrcygyd lns'pywssp sdll'ellvpg vskkpslsvq p'gpv'vages
 241 ltlqcvsdvg ydrfvlykeg erdlrqlpgr qpqaqlsqan ftl'gpvsrsy gqyrcy'gay
 301 nl'ssewsaps dpldilitgq ihgtpf'isvq pgptvasgen vtll'cqs'wrq fhtflitkag
 361 aadaplr'rs ih'ey'pkyqae fpmasv'tsah agtyrcygal nsdpyllshp sep'lelv'sg
 421 psmgss'pppt gp'ist'pagpe dqpl'tptged pq'agl'rhlg v'vigil'vav llllllll'if
 481 l'ilr'rrqgk hwtstqrkad fqhpagavgp eptdrqlqwr s'paada'qee n'lyaavkdtq
 541 pedgvem'dtr aaaseapqdv tyaqlh'sltl r'rkate'ppps qere'ppaeps i'yat'laih

```

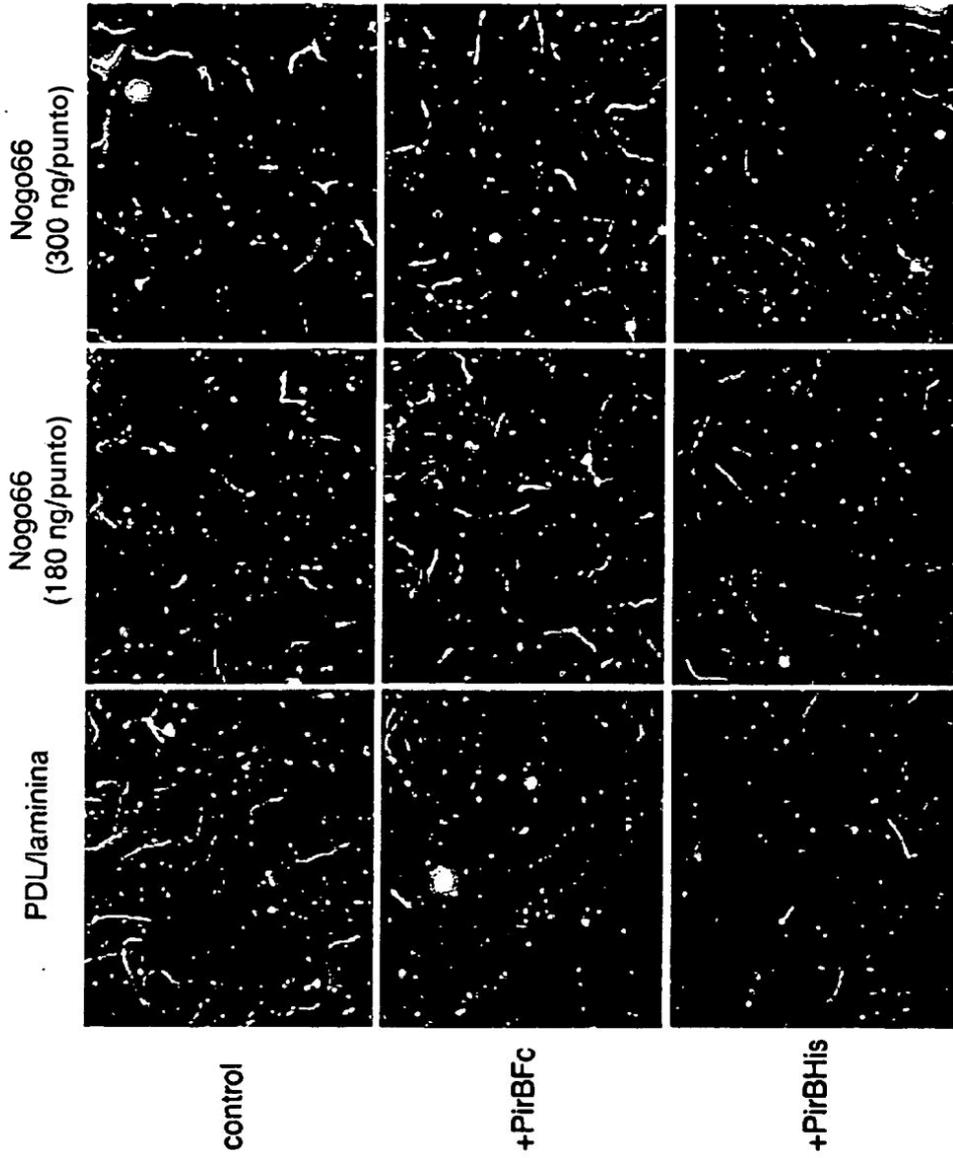


Figura 6

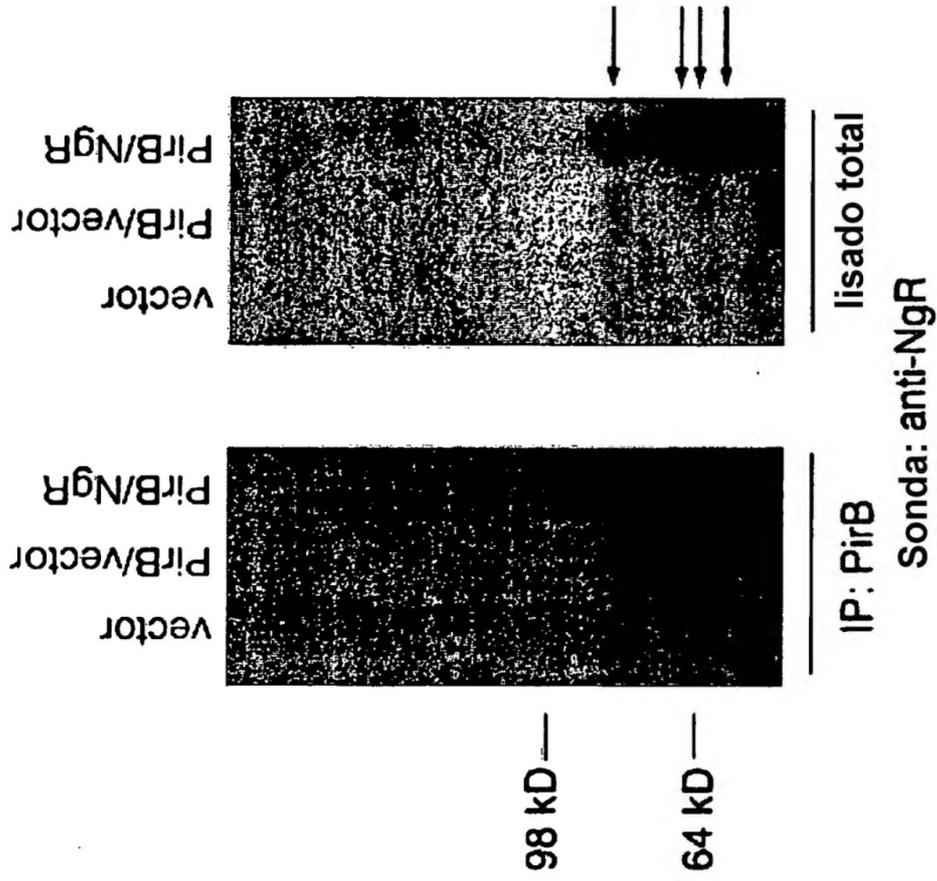
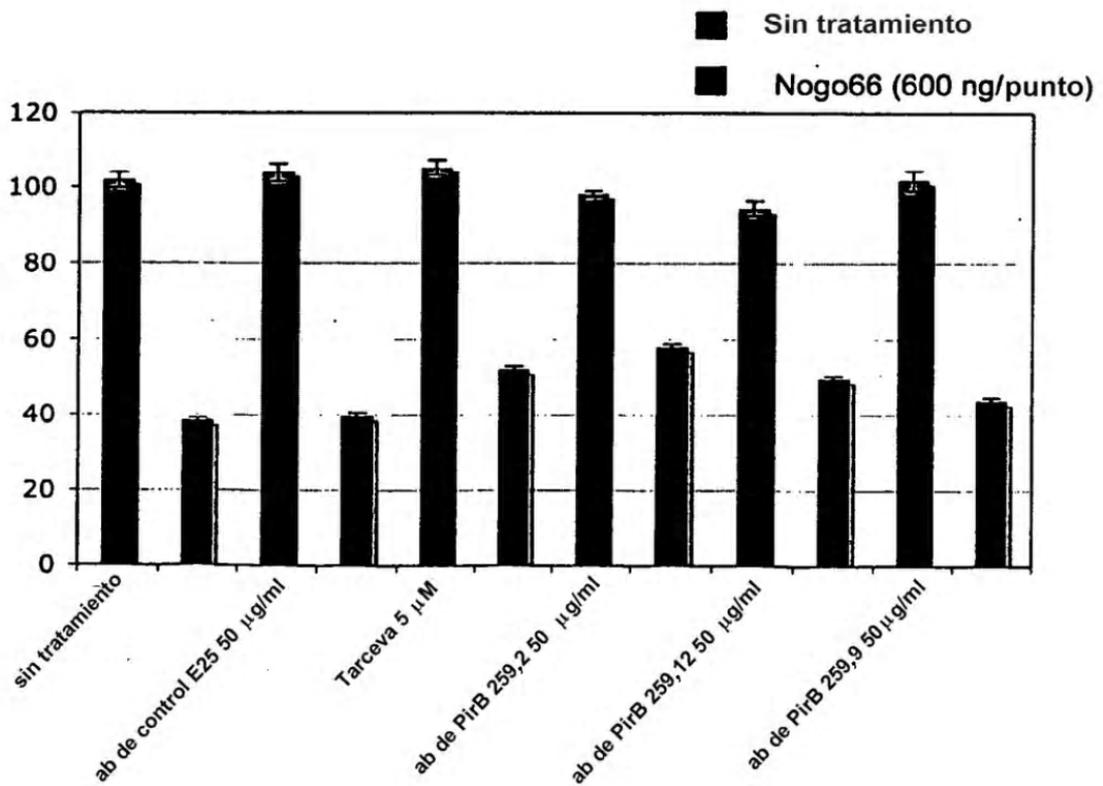
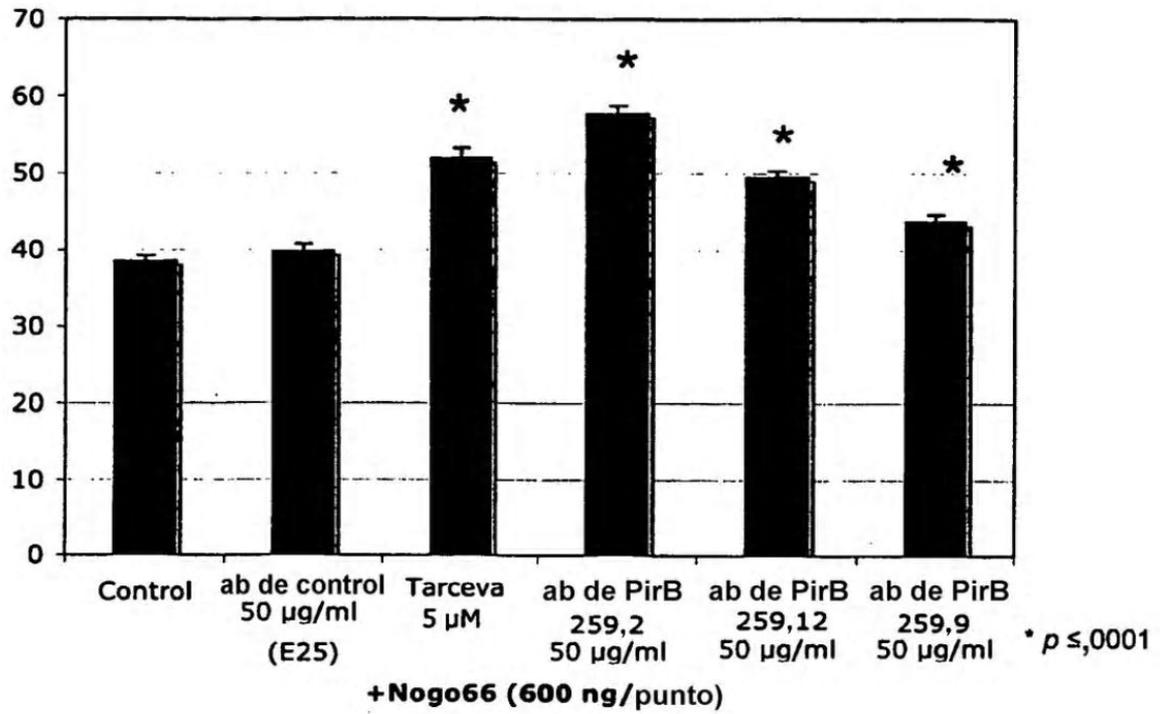


Figura 7

FIGURA 8



LILRB1, variante de transcrito 1:

MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQET
QEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSES
SDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDHP
QCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWLPSDLLELLVL
GVSKKPSLSVQPGPIVAPEETLTLQCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQ
AGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSEWSAPSDPLDILAGQFYDRVLSL
VQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMTFLLTKEGAADDPWRLRSTYQSQKYQAEF
PMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSG
PEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVILLLLLLLLLLLFLILRHRROGKHWT
TQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVE
MDTRSPHDEDPAV TYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMD
TEAAASEAPQDV TYAQLHSLTLREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH

FIGURA 9

LILRB 1, variante de transcrito 2:

MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQET
QEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSES
SDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDHP
QCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWLPSDLLELLVL
GVSKKPSLSVQPGPIVAPEETLTLQCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQ
AGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSEWSAPSDPLDILAGQFYDRVLSL
VQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMTFLLTKEGAADDPWRLRSTYQSQKYQAEF
PMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSA
GPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVILLLLLLLLLLLFLILRHRROGKHWT
STQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVE
MDTRQSPHDEDPAV TYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMD
DTEAAASEAPQDV TYAQLHSLTLREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH

FIGURA 10

LILRB1, variante de transcrito 3:

MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQET
QEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPISITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSES
SDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHP
QCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWSLPSDLELLVL
GVSKKPSLSVQPGPIVAPEETLTLQCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQ
AGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSEWSAPSDPLDILAGQFYDRVSLS
VQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMTFLLTKEGAADDPWRLRSTYQSQKYQAEF
PMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSA
GPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVILLLLLLLLLLFLILRHRROGKHWT
STQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVE
MDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQM
TEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH

FIGURA 11

LILRB1, variante de transcrito 4:

MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQET
QEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPISITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSES
SDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHP
QCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWSLPSDLELLVL
GVSKKPSLSVQPGPIVAPEETLTLQCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQ
AGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSEWSAPSDPLDILAGQFYDRVSLS
VQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMTFLLTKEGAADDPWRLRSTYQSQKYQAEF
PMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSG
PEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVILLLLLLLLLLFLILRHRROGKHWT
TQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVE
MDTRQSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQM
DTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH

FIGURA 12

LILRB2, variante de transcrito 2:

MTPIVTVLICLGLSLGPRTHVQTGTIPKPTLWAEPDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQE
YRLYREKKSASWTRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDP
LVLVMTGAYPKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQCESQVAFGGFILCKEGEEHPQCL
NSQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLELLVPGVS
KKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVSDVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPQAGL
SQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGP
TVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKAGAADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPVTS
AHAGTYRCYGSLNSDPYLLSHPSEPLELVVSGPSMGSSPPPTGPISTPGPEDQPLTP
TGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVVLLLLLLLLLFLILRHRRQGHWTSTQRKADF
QHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQENLYAAVKDTQPEDGVEMDTRAAA
SEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPSIYATLAIH*

FIGURA 13

LILRB3, variante de transcrito 1:

MTPALTALLCLGLSLGPRTRVQAGPFPKPTLWAEPGSVISWGSPVTIWCQGSQEA
QEYRLHKEGSPEPLDRNNPLEPKNKARFSIPSMTEHHAGRYRCHYYSSAGWSEPS
DPLEMVMTGAYSKPTLSALPSPVVASGGNMTLRCSQKGYHHFVLMKEGEHQL
PRTLDSQQLHSRGFQALFPVGPVTPSHRWFTCYYYTNTPWVWVSHPSDPLEILP
SGVSRKPSLLTLQGPVLAPGQSLTLQCGSDVGYNRFVLYKEGERDFLQRPQQP
QAGLSQANFTLGPVSPSNGGQYRCYGAHNLSSEWSAPSDPLNILMAGQIYDTVS
LSAQPGPTVASGENVTLLCQSWWQFDTFLLTKEGAAHPPLRLRSMYGAHKYQA
EFPMSPVTSAHAGTYRCYGSYSSNPILLSHPSEPLELVVSGHSGGSSLPTGPPST
PGLGRYLEVLIGVSVAFVLLLFLLLFLLRRQRHSHKRTSDQRKTDQRPAGAAE
TEPKDRGLLRRSSPAADVQENLYAAVKDTQSEDRVELDSQQSPHDEDPAVY
APVKHSSPRREMASPPSSLGFEFLDKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQ
LHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPSIYATLAIH

FIGURA 14

LILRB3, variante de transcrito 2:

MTPALTALLCLGLSLGPRTRVQAGPFPKPTLWAEPGSVISWGPVTIWCQGSQEA
QEYRLHKEGSPEPLDRNNPLEPKNKARFSIPSMTEHHAGRYRCHYYSSAGWSEPS
DPLEMVMTGAYSKPTLSALPSPVVASGGNMTLRCGSQKGYHHFVLMKEGEHQL
PRTLDSQQLHSRGFQALFPVGPVTPSHRWRFTCYYYTNTPWVWSHPSDPLEILP
SGVSRKPSLLTLQGPVLAPGQSLTLQCGSDVGYNRFVLYKEGERDFLQRPQQP
QAGLSQANFTLGPVSPSNGGQYRCYGAHNLSSEWSAPSDPLNILMAGQIYDTVS
LSAQPGPTVASENVTLQCQSWWQFDTFLLTKEGAAHPPLRLRSMYGAHKYQA
EFPMSPV TSAHAGTYRCYGSYSSNPHELLSHPSEPLELVVSGHSGGSSLPTGPPST
PGLGRYLEVLIGVSVAFVLLLFLLLFLLRRQRHSHKRTSDQRKTDQFQRPAGAAE
TEPKDRGLLRRSSPAADVQEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPHDEDPQAVTYA
PVKHSSPRREMASPPSSLSGEFLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQL
HSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPSTIYATLAIH

FIGURA 15

LILRB5, variante de transcrito 1:

MTLTLVLIICLGLSVGPRTCVQAGTLPKPTLWAEPASVIARGKPVTLWCQGPLET
EEYRLDKEGLPWARKRQNPLEPGAKAKFHIPSTVYDSAGRYRCYYETPAGWSEP
SDPLELVATGFYAEPTLLALPSPVVASGGNVTLQCDTLDGLLTFVLVEEEQKLPR
TLYSQKLPKGPSQALFPVGPVTPSCRWRFRCYYYRKNPQVWSNPSDLLEILVPG
VSRKPSLLIPQGSVVARGGSLTLQCRSDVGYDIFVLYKEGEHDLVQSGGQQPQA
GLSQANFTLGPVSRSHGGQYRCYGAHNLSRWSAPSDPLDILAGLIPDIPALSVQ
PGPKVASGENVTLLCQSWHQIDTFFLTKEGAAHPPLCLKSKYQSYRHQA EFSMS
PV TSAQGGTYRCYSAIRSYPYLLSSPSYPQELVVSGPSGDPSLSPTGSTPTPAGPED
QPLTPTGLDPQSGLGRHLGVVTGVSVAFVLLLFLLLFLLLRHRHQSKHRTSAHFY
RPAGAAGPEPKDQGLQKRASPVADIQEEILNAAVKDTQPKDGVEMDARAAASE
APQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEREPPAEPSTIYAPLAIH

FIGURA 16

LILRB5, variante de transcrito 2:

MTLTLVLIICLGLSVGPRTCQAGTLPKPTLWAEPASVIARGKPVTLWCQGPLET
EEYRLDKEGLPWARKRQNPLEPGAKAKFHIPSTVYDSAGRYRCYYETPAGWSEP
SDPLELVATGFYAEPTLLALPSPVVASGGNVTLQCDTLDGLLTFVLVEEEQKLPR
TLYSQKLPKGPSQALFPVGPVTPSCRWRFRCYYYRKNPQVWSNPSDLLEILVPG
VSRKPSLLIPQGSVVARGGSLTLQCRSDVGYDIFVLYKEGEHDLVQSGGQQPQA
GLSQANFTLGPVSRSHGGQYRCYGAHNLSRWSAPSDPLDILIAGLIPDIPALSQ
PGPKVASGENVTLLCQSWHQIDTFFLTKEGAAHPPLCLKSKYQSYRHQAEFMS
PV TSAQGGTYRCYSAIRSYPYLLSSPSYPQELVVS GPSGDPSLSPTGSTPTPGPEDQ
PLTPTGLDPQSGLGRHLGVVTGVSVAFVLLL FLLL FLLL RHRHQSKHR TSAHFYR
PAGAAGPEPKDQGLQKRASPVADIQEEILNAAVKDTQPKDGVEMDARAAASEA
PQDV TYAQLHSLTLRREATEPPPSQEREPPAEPSIYAPLAIH

FIGURA 17

LILRB5, variante de transcrito 3:

MTLTLVLIICLGLSVGPRTCQAGTLPKPTLWAEPASVIARGKPVTLWCQGPLET
EEYRLDKEGLPWARKRQNPLEPGAKAKFHIPSTVYDSAGRYRCYYETPAGWSEP
SDPLELVATGVSRKPSLLIPQGSVVARGGSLTLQCRSDVGYDIFVLYKEGEHDLV
QSGGQQPQAGLSQANFTLGPVSRSHGGQYRCYGAHNLSRWSAPSDPLDILIA
GLIPDIPALSQPGPKVASGENVTLLCQSWHQIDTFFLTKEGAAHPPLCLKSKYQSY
RHQAEFMSMPV TSAQGGTYRCYSAIRSYPYLLSSPSYPQELVVS GPSGDPSLSPTG
STPTPAGPEDQPLTPTGLDPQSGLGRHLGVVTGVSVAFVLLL FLLL FLLL RHRHQ
SKHR TSAHFYR PAGAAGPEPKDQGLQKRASPVADIQEEILNAAVKDTQPKDGV
EMDARAAASEAPQDV TYAQLHSLTLRREATEPPPSQEREPPAEPSIYAPLAIH

FIGURA 18