

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 313**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2010 E 10721376 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2424897**

54 Título: **Anticuerpos anti-CXCR4 para el tratamiento del VIH**

30 Prioridad:

29.04.2009 EP 09159076

29.04.2009 US 173680 P

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

21.04.2015

73 Titular/es:

PIERRE FABRE MÉDICAMENT (100.0%)

45, Place Abel Gance

92100 Boulogne-Billancourt, FR

72 Inventor/es:

KLINGUER-HAMOUR, CHRISTINE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 534 313 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CXCR4 para el tratamiento del VIH.

5 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales murinos, híbridos y humanizados, que pueden unirse específicamente a los receptores de quimiocinas (CXCR), así como la secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos. Desde un aspecto, la invención se refiere a nuevos anticuerpos, y sus fragmentos funcionales, que pueden unirse específicamente al CXCR4 y que presenten una potente actividad contra la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La invención también
10 comprende la utilización de dichos anticuerpos, y sus fragmentos funcionales como un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de la infección por VIH.

Las quimiocinas son pequeños péptidos segregados, que controlan la migración de los leucocitos a lo largo de un gradiente químico de ligando, conocido como gradiente de quimiocinas, especialmente durante las reacciones inmunitarias (Zlotnick A. *et al.*, 2000). Se dividen en dos subfamilias principales, CC y CXC, en base a la posición de sus restos de cisteína del terminal NH₂, y se unen a receptores acoplados a la proteína G, cuyos dos principales subfamilias se denominan CCR y CXCR. Más de 50 quimiocinas humanas y 18 receptores de quimiocinas se han descubierto hasta el momento.

20 Algunos miembros de la familia de receptores de la quimiocina actúan como correceptores con el receptor primario CD4 para permitir la entrada de varias cepas del VIH de tipo 1 en las células, siendo los correceptores principales CCR5 y CXCR4. El VIH-1 de X4 trópico de linfocitos T utiliza el CD4 y el CXCR4 para la entrada en las células, mientras que el VIH-1 de R5 trópico de macrófagos utiliza el CD4 y el CCR5. Las cepas dual-trópicas pueden utilizar el CXCR4 y el CCR5 como correceptores. Los CCR3, CCR2, CCR8, CXCR6, CXCR7, CX3CR1, de entre otros
25 receptores de la quimiocina, pueden actuar como correceptores por un subconjunto más restringido de cepas de VIH.

El SDF-1, el ligando natural de CXCR4 así como los ligandos CCL3, CCL4, CCL4-L1, y CCL5 para CCR5 pueden inhibir la infección y la fusión celular por varias cepas de VIH-1. Estos descubrimientos han estimulado el desarrollo de tratamientos anti-VIH que diana los receptores de la quimiocina que condujeron a la aprobación del maraviroc (CELSENTRI®), un antagonista de moléculas pequeñas del CCR5 en combinación con otros agentes anti-VIH-1 en pacientes infectados por el VIH-1 CCR5-trópico. Sin embargo, el maraviroc no es utilizado ni en pacientes infectados por el VIH-1 dual-trópico ni en pacientes infectados por el VIH-1 CXCR4-trópico (VIDAL 2009). Por lo tanto existe una necesidad médica evidente de extender este tipo de terapia en los pacientes infectados por el VIH X4-trópico y dual-trópico identificando los antagonistas de CXCR4 que pueden inhibir la replicación de VIH X4-trópico.

El receptor 4 de quimiocinas (también conocido como fusina, CD184, LESTR o HUMSTR) existe como dos isoformas que comprenden 352 o 360 aminoácidos. El resto ASN11 está glucosilado, el resto Tyr21 se modifica por adición de un grupo sulfato y Cys 109 y 186 se unen con un puente disulfuro en la parte extracelular del receptor (Juarez J. *et al.*, 2004).

Este receptor es expresado por diferentes tipos de tejidos normales, naturales, linfocitos T sin memoria, linfocitos T reguladores, linfocitos B, neutrófilos, células endoteliales, monocitos primarios, dendrocitos, linfocitos citotóxicos naturales, células madre hematopoyéticas CD34+ y a un bajo nivel en el corazón, colon, hígado, riñones y cerebro. CXCR4 desempeña una función clave en el tráfico de leucocitos, linfopoyesis y mielopoyesis de linfocitos B.

El ligando único del receptor CXCR4 descrito hasta el momento es el Factor-1 derivado de células del estroma (SDF-1) o CXCL2. SDF-1 se segrega en gran cantidad en el ganglio linfático, la médula ósea, el hígado, el pulmón y en menor medida por los riñones, el cerebro y la piel. CXCR4 también es reconocido por una quimiocina antagónica, la proteína II inflamatoria de macrófagos víricos (vMIP-II) codificada por el herpesvirus humano tipo III.

Como se ha mencionado anteriormente, el receptor CXCR4 es el correceptor principal para los aislados de VIH-1 linfocitos T-trópico (virus X4). La interferencia con este receptor debería inhibir la replicación de los virus X4 de una manera muy eficaz.

55 Uno de los aspectos inventivos de la presente invención es el de generar anticuerpos monoclonal de ratón (Mabs) que inhiben la replicación del VIH. La invención comprende un Mab 515H7 de CXCR4 (o sus fragmentos) que puede unirse a los homodímeros de CXCR4, y que presenta unas actividades potentes contra la infección por VIH. La invención comprende asimismo un Mab 301aE5 de CXCR4 (o sus fragmentos) que puede unirse a los homodímeros de CXCR4, y que presenta unas actividades potentes contra la infección por VIH.

Inesperadamente, se han conseguido generar anticuerpos monoclonales que pueden unirse a CXCR4 pero también producir cambios de configuración de los homodímeros y/o heterodímeros CXCR4 y pueden inhibir la replicación del aislado primario de VIH-1 X4 en las PBMC. Más específicamente, los anticuerpos de la invención pueden asimismo
65 inhibir la replicación del aislado primario de VIH-1 X4/R5.

Preferentemente, el compuesto CXCR4 es una de las dos isoformas CXCR4 humanas seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- la isoforma b del receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C) [*Homo sapiens*] que tiene la secuencia representada con el número de registro del Genbank NP_003458 (SEC ID nº 27):

```
MEGISIYTSNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREANANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGN
GLVILVMGYQKRLRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFL
CKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIHVHATNSQRPRKLLAEKVVYVGVWI
PALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSC
YCIISKLSHSGHGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIKQGCEFE
NTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSSLKILSKG
KRGHSSVSTESESSSFHSS;
```

- la isoforma a del receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C) [*Homo sapiens*] que tiene la secuencia representada con el número de registro de Genbank NP_001008540 SEC ID nº 28):

```
MSIPLPLLQIYTSNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREANANFNKIFLPTIYSIIFLTGI
VGNGLVILVMGYQKRLRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFG EP 2 424 897 B1 3 5 10 15 20
25 30 35 40 45 50 55 NFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIHVHATNSQRPRKLLAEKVVYVGV
VWIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVI
LSCYCIISKLSHSGHGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIKQGC
EFENTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSSLKILS
KGKRGHSSVSTESESSSFHSS;
```

- una variante de corte y empalme de la transcripción alternativa o una variante natural de la misma que tiene por lo menos 95% de identidad con una de estas isoformas b o a que tienen la SEC ID nº 27 o 28, y
- un fragmento de la misma que puede ser reconocido específicamente por su factor-1 derivado de células del estroma del ligando natural (SDF-1) y que tiene preferentemente por lo menos 100, 150 y 200 aminoácidos de longitud.

CXCR2 se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- el receptor beta de interleucina 8 [*Homo sapiens*] que tiene la secuencia representada bajo el número de registro de Genbank NP_001548 (SEC ID nº 29):

```
MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLLDAAPEPESLEINKYFVVIY
ALVFLSLLGNLSVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPWAASKV
NGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRRLTQKRYLVKF
ICLSIWGLSLLALPVLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRILPQSF
GFIVPLLIMLFCYGFTLRTLFAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVL
ADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIYAFIQKFRHGLLKI
LAIHGLISKDSLPRPSFVGSSSGHTSTTL;
```

- una variante de corte y empalme alternativa de la transcripción o una variante natural de la misma que tiene por lo menos 95% de identidad con este receptor beta de interleucina 8 que tiene la SEC ID nº 29; y
- un fragmento de la misma capaz de ser reconocido específicamente por la IL-8 y que tiene preferentemente por lo menos 100, 150 y 200 aminoácidos de longitud.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para seleccionar un compuesto que tiene una actividad anti-VIH o que se puede utilizar para la preparación de una composición para el tratamiento de la infección por VIH, caracterizado por que dicho procedimiento comprende la etapa de:

En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento para la generación y la selección de anticuerpos según la invención.

Más particularmente, es divulgado en la presente memoria un procedimiento para la selección de un anticuerpo anti-CXCR4, o uno de sus fragmentos funcionales, que puede inhibir la replicación del VIH, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- i) detectar los anticuerpos generados y seleccionar los anticuerpos capaces de unirse específicamente a CXCR4;
- ii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa i) y seleccionar anticuerpos capaces de producir

cambio de configuración de homodímeros CXCR4, y a continuación

5 iii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa ii) y seleccionar anticuerpos capaces de producir cambio de configuración de heterodímeros CXCR4/CXCR2.

iv) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa iii) y seleccionar los anticuerpos que pueden inhibir la replicación de VIH-1 X4-trópico de aislados primarios en las PBMC.

10 En otra forma de realización, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la selección de un anticuerpo anti-CXCR4, o uno de sus fragmentos funcionales, que puede inhibir la replicación del VIH que comprende las etapas siguientes:

15 i) cribar los anticuerpos generados y seleccionar los anticuerpos que pueden unirse específicamente CXCR4;

ii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa i) y seleccionar los anticuerpos que pueden unirse a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC),

20 iii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa ii) y seleccionar los anticuerpos que pueden unirse al homodímero de CXCR4, y a continuación

iv) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa iii) y seleccionar los anticuerpos que pueden inhibir la replicación de VIH-1 X4-trópico de aislados primarios en las PBMC y/o que pueden inhibir la replicación del VIH-1 X4/R5-trópico de aislados primarios en las PBMC.

25 La generación de los anticuerpos se puede realizar por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, una fusión de una célula de mieloma con células de bazo de ratones inmunizados u otras especies compatibles con las células de mieloma seleccionadas [Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497]. Los animales inmunizados podrían incluir ratones transgénicos con los locus de inmunoglobulina humana que luego producen directamente anticuerpos humanos. Otra posible forma de realización podría consistir en la utilización de tecnologías de presentación de fagos para detectar bibliotecas.

35 Las etapas i) e ii) de detección se pueden realizar por cualquier método o procedimiento conocido por los expertos en la materia. Como ejemplos no restrictivos, se pueden mencionar ELISA, BIAcore, inmunohistoquímica, inmunotransferencia utilizando extractos de membrana de célula que expresa CXCR4 o CXCR4 purificado, análisis FACS y detecciones funcionales. Un procedimiento preferido consiste en una detección por análisis FACS sobre CXCR4 transfectante (etapa 1) y por lo menos en PBMC (etapa 2) para asegurarse de que los anticuerpos producidos serán capaces de reconocer también la conformación del receptor natural CXCR4 en la superficie celular diana. Este procedimiento se describirá con mayor detalle en los ejemplos siguientes.

40 La etapa de cribado iii) puede realizarse mediante cualquier método o procedimiento conocido por el experto en la materia. Como ejemplo no limitativo pero preferido, pueden mencionarse la inmunotransferencia y/o las técnicas de inmunoprecipitación que utilizan los anticuerpos de interés sobre un extracto de membrana de las células transfectadas de CXCR4 o PBMC.

45 La etapa de cribado iv) puede ser realizada mediante cualquier método o procedimiento conocido por el experto en la materia. Como ejemplo no limitativo pero preferido, puede mencionarse un procedimiento que consiste en cribar los anticuerpos respecto a su capacidad para inhibir la replicación de aislados de X4/X5 de VIH-1 primarios y/o de X4 de VIH-1 primarios en las PBMC utilizando un protocolo descrito por Holl et al. (*J. Immunol.* 2004, 173, 6274-83).

50 En una forma de realización preferida de la etapa iii) de selección del procedimiento divulgado en la presente memoria, dicha etapa iii) consiste en la determinación de anticuerpos por análisis BRET en células que expresan CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y la selección de anticuerpos capaces de inhibir por lo menos el 40%, preferentemente el 45%, 50%, 55% y lo más preferentemente 60% de la señal de BRET.

55 La tecnología BRET es una tecnología conocida como representativa de la dimerización de proteínas [Angers *et al.*, *PNAS*, 2000, 97:3684-89].

60 La tecnología BRET, utilizada en la etapa iii) del procedimiento, es bien conocida por el experto en la materia y se detalla en los siguientes ejemplos. Más específicamente, BRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Bioluminiscencia) es una transferencia de energía no radiante que se produce entre un donante bioluminiscente (*Renilla Luciferasa* (Rluc)) y un aceptador fluorescente, un mutante de GFP (proteína verde fluorescente) o YFP (proteína fluorescente amarilla). En el presente caso se utilizó EYFP (proteína amarilla fluorescente mejorada). La eficacia de la transferencia depende de la orientación y la distancia entre el donante y el aceptador. Entonces, la transferencia de energía puede ocurrir sólo si las dos moléculas están en estrecha proximidad (1-10 nm). Esta propiedad se utiliza para generar ensayos de interacción proteína-proteína. De hecho, a fin de estudiar la interacción entre dos parejas, la primera se fusiona genéticamente a la *Renilla Luciferasa* y la segunda al mutante amarillo de la

GFP. Las proteínas de fusión se expresan generalmente, pero no obligatoriamente, en células de mamífero. En presencia de su sustrato permeable de membranas (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Si el mutante de GFP está más cerca de 10 nm de la Rluc, puede ocurrir una transferencia de energía y puede detectarse una señal amarilla adicional. La señal de BRET se mide como la relación entre la luz emitida por el aceptador y la luz emitida por el donante. Así que la señal de BRET aumentará a medida que las dos proteínas de fusión se aproximan o si un cambio de configuración se aproxima a Rluc y al mutante de GFP.

Si el análisis de BRET consiste en una forma de realización preferida, cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia puede utilizarse para medir cambios de configuración en dímeros CXCR4. Sin limitación, se pueden mencionar las siguientes tecnologías: FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), HTRF (fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo), FLIM (Microscopia por duración de la fluorescencia para diagnóstico por Imagen) o SW-FCCS (espectroscopia de correlación cruzada de fluorescencia de una sola longitud de onda).

Otras tecnologías clásicas también podrían utilizarse, tales como coimmunoprecipitación, Alpha Screen, reticulación química, doble híbrido, cromatografía de afinidad, ELISA o inmunotransferencia Far western.

En un aspecto particular de dicho procedimiento, la etapa iii) consiste en la determinación de anticuerpos por análisis BRET en células que expresan ambos CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y que seleccionan anticuerpos capaces de inhibir por lo menos 40%, de la señal de BRET.

En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a anticuerpos aislados, o a uno de sus fragmentos funcionales de los mismos, que se obtienen por dicho procedimiento. Dichos anticuerpos o uno de sus dichos fragmentos o derivados, pueden unirse específicamente a la CXCR4 humana, pudiendo también dichos anticuerpos producir cambios de configuración en los homodímeros de CXCR4.

Es conocido a partir de la literatura que los Mab de CXCR4 como, por ejemplo, el clon A120, pueden inhibir la entrada de la cepa de laboratorio de VIH-1 (X4HIV-1_{NL4-3}) en las PBMC (Tanaka R, et al, J. Virol. 2001, 75, 11534-11543). Además, es asimismo conocido que los Mab de CXCR4 pueden inhibir los aislados primarios de X4 de VIH-1 en las estirpes celulares que expresan CXCR4. Por el contrario, no se ha divulgado nunca un anticuerpo que pueda inhibir dicho virus en su ambiente natural, es decir, no únicamente sobre los virus de laboratorio o estirpes celulares. Sin embargo, resulta un aspecto nuevo y no obvio de la invención que los Mab de CXCR4 puedan inhibir los aislados primarios de X4 de VIH-1 en las PBMC.

Las expresiones "fragmentos funcionales" se definirán con detalle a continuación en la presente memoria.

Más concretamente, se reivindican unos anticuerpos aislados, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, caracterizándose dichos anticuerpos por que comprenden por lo menos una región determinante de complementariedad CDR seleccionada de entre las CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1 a 6 y 30 a 22 como se define mediante el sistema de numeración IMGT.

Según un primer aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo humanizado aislado, o a un derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre las CDR de las secuencias SEC ID nº 1 a 6, tal como se define según el sistema de numeración IMGT, o por lo menos una CDR cuya secuencia tiene por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 1 a 6.

Según un segundo aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre las CDR de secuencias SEC ID nº 1, 2 y 30 a 33, como se define según el sistema de numeración IMGT, o por lo menos una CDR cuya secuencia presente una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 30 a 33.

Un "fragmento funcional" de un anticuerpo significa, en particular, un fragmento de anticuerpo, tal como los fragmentos Fv, scFv (sc = cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media se ha aumentado. Dichos fragmentos funcionales se describirán con detalle a continuación en la presente descripción.

Un "compuesto derivado" o "derivado" de un anticuerpo significa, en particular, una proteína de fijación compuesta por una estructura peptídica y por lo menos una de las CDR del anticuerpo original a fin de conservar su capacidad de reconocer a CXCR4. Dichos compuestos derivados, bien conocidos para un experto en la materia, se describirán con mayor detalle a continuación en la presente descripción.

Más preferentemente, la invención comprende los anticuerpos, y sus derivados o sus fragmentos funcionales, según la presente invención, particularmente híbridos o humanizados, obtenidos por recombinación genética o síntesis química.

Según una forma de realización preferida, el anticuerpo según la invención, o sus fragmentos funcionales, se caracteriza por que comprende un anticuerpo monoclonal.

5 "Anticuerpo monoclonal" significa un anticuerpo que surge de una población de anticuerpos casi homogénea. Más particularmente, cada uno de los anticuerpos de una población son idénticos excepto por unas pocas mutaciones naturales posibles que pueden encontrarse en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal comprende un anticuerpo homogéneo derivado del crecimiento de un solo clon de células (por ejemplo, un hibridoma, una célula hospedadora eucariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, una célula hospedadora procariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.) y se caracteriza generalmente por cadenas pesadas de una y sólo una clase y subclase, y cadenas ligeras de un solo tipo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que suelen incluir varios anticuerpos dirigidos contra varios determinantes, o epítomos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único epítomo del antígeno.

Más particularmente, el anticuerpo o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados por que comprenden una cadena ligera que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en los que:

- CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1,
- CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2,
- CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3.

25 Según otra forma de realización, los anticuerpos o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados por que comprenden una cadena ligera que comprende por lo menos una de las tres CDR de las secuencias SEC ID nº 1, 2 o 3, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 1, 2 o 3.

30 El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, está caracterizado asimismo por que comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en los que CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3.

35 En otra forma de realización, el anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, está caracterizado por que comprende una cadena ligera de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 7.

40 Según una segunda forma de realización preferida, el anticuerpo o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados por que comprenden una cadena ligera que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en los que:

- CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1,
- CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2,
- CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 30.

50 Según otra forma de realización, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados por que comprenden una cadena ligera que comprende por lo menos una de las tres CDR de las secuencias SEC ID nº 1, 2 o 30, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 1, 2 o 30.

55 El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, está asimismo caracterizado por que comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en los que CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 30.

60 En otra forma de realización, el anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, está caracterizado por que comprende una cadena ligera de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 34, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 34.

Más particularmente, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, está caracterizado por que comprenden una cadena pesada que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en el que:

- CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4,
- CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5,
- CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6.

5 Según otra forma de realización, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, está caracterizado por que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una de las tres CDR de las secuencias SEC ID nº 4, 5 o 6, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 4, 5 o 6.

10 Según otra forma de realización particular, los anticuerpos, o unos de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados por que comprenden una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en los que CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5 y la CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6.

15 En otra forma de realización, el anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, está caracterizado por que comprende una cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 8.

20 Más particularmente, dichos anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales están caracterizados por que comprenden una cadena pesada que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en los que:

- CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 31,
- 25 - CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32,
- CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 33.

30 Según otra forma de realización, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados por que comprenden una cadena pesada que comprende por lo menos una de las tres CDR de las secuencias SEC ID nº 31, 32 o 33, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 31, 32 o 33.

35 Según otra forma de realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados por que comprenden una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en los que CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 31, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32 y la CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 33.

40 En otra forma de realización, dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, está caracterizado por que comprende una cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 35.

45 El anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, está caracterizado por que comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1, 2 y 3; y una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4, 5 y 6.

50 El anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, está caracterizado asimismo por que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8.

55 El anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, está caracterizado por que comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1, 2 y 30; y una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 31, 32 y 33.

60 El anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, puede estar asimismo caracterizado por que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 34 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35.

65 En la presente descripción, los términos "polipéptidos", "secuencias polipeptídicas", "péptidos" y "proteínas unidas a compuestos de anticuerpos o a sus secuencias" son intercambiables.

Debe apreciarse que la invención no se refiere a anticuerpos en forma natural, es decir, no se toman de su entorno natural sino que son aislados u obtenidos por purificación a partir de fuentes naturales u obtenidos por recombinación genética o síntesis química y pueden ser por lo tanto portadores de aminoácidos no naturales como

se describe a continuación.

En una primera forma de realización, la región determinante de complementariedad, o CDR, hace referencia a las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas como se define por Kabat *et al.* (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5ª Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, y ediciones posteriores). Existen tres CDR de la cadena pesada y tres CDR de la cadena ligera. En la presente memoria, los términos "CDR" "CDRs" son utilizados para indicar, en función del caso, una o más, o incluso la totalidad, de las regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables de la afinidad por la unión al anticuerpo para el antígeno o epítipo que reconoce.

En una segunda forma de realización, mediante regiones CDR o CDR(s), se pretenden indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas como se define por el IMGT.

La numeración única de IMGT se ha definido para comparar los dominios variables de cualquiera que sea el receptor de antígenos, el tipo de cadena, o las especies [Lefranc M.-P., *Immunology Today* 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados siempre tienen la misma posición, por ejemplo, cisteína 23 (1ª-CYS), triptófano 41 (TRP CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2ª-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones marco (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT 105 a 117. En cuanto a los huecos representan posiciones desocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (presentadas entre paréntesis y separados por puntos, p. ej., [8.8.13]) se convierten en información crucial. La numeración única de IMGT se utiliza en representaciones gráficas 2D, denominadas IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras 3D en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, P., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. *Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

Existen tres CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR se utiliza en la presente memoria para indicar, según el caso, una o varias de estas regiones, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los restos de aminoácidos responsables de la fijación por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

Para una mayor claridad, debe apreciarse que en la descripción siguiente, y más particularmente en las tablas 2 y 3, las CDR serán definidas mediante el sistema de numeración IMGT y mediante el sistema de numeración de Kabat.

El sistema de numeración IMGT define las CDR según el sistema IMGT como se ha definido anteriormente mientras que el sistema de numeración de Kabat define las CDR según el sistema de Kabat como se ha definido anteriormente.

Más particularmente, respecto al anticuerpo al que se hace referencia como 515H7, la CDR-L1 consiste en la SEC ID nº 1 en los sistemas de numeración IMGT y de SEC ID nº 9 en el sistema de numeración de Kabat. Respecto a la CDR-L2, consiste en la SEC ID nº 2 en los sistemas de numeración IMGT y de SEC ID nº 10 en el sistema de numeración de Kabat. La CDR-L3 consiste en la SEC ID nº 3 para cada uno de los sistemas de numeración. Para la cadena pesada, la CDR-H1 consiste en la SEC ID nº 4 en el sistema de numeración IMGT y SEC ID nº 11 en el sistema de numeración de Kabat. La CDR-H2 consiste en la SEC ID nº 5 en el sistema de numeración IMGT y SEC ID nº 12 en el sistema de numeración de Kabat. Finalmente, la CDR-H3 consiste en la SEC ID nº 6 en el sistema de numeración IMGT mientras que consiste en la SEC ID nº 13 en el sistema de numeración de Kabat.

A continuación, respecto al anticuerpo al que se hace referencia como 301aE5, la CDR-L1 consiste en la SEC ID nº 1 en los sistemas de numeración IMGT y en la SEC ID nº 9 en el sistema de numeración de Kabat. Respecto a la CDR-L2, consiste en la SEC ID nº 2 en los sistemas de numeración IMGT y en la SEC ID nº 36 en el sistema de numeración de Kabat. La CDR-L3 consiste en la SEC ID nº 30 en los sistemas de numeración IMGT y en la SEC ID nº 37 en el sistema de numeración de Kabat. Para la cadena pesada, la CDR-H1 consiste en la SEC ID nº 31 en el sistema de numeración IMGT y en la SEC ID nº 38 en el sistema de numeración de Kabat. La CDR-H2 consiste en la SEC ID nº 32 en los sistemas de numeración de IMGT y en la SEC ID nº 39 en el sistema de numeración de Kabat. Finalmente, la CDR-H3 consiste en la SEC ID nº 33 en los sistemas de numeración IMGT mientras que consiste en la SEC ID nº 40 en el sistema de numeración de Kabat.

Tal como se utiliza en la presente invención, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos significa el porcentaje de nucleótidos o restos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después de la alineación óptima, siendo este porcentaje puramente estadístico y estando las diferencias entre las dos secuencias distribuidas al azar en toda su longitud. La comparación de dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos se lleva a cabo tradicionalmente comparando las secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, pudiendo llevarse a cabo dicha comparación por segmentos o utilizando un

"intervalo de alineación". La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de la comparación manual, mediante el algoritmo local de homología de Smith y Waterman (1981) [*Ad. App. Math.* 2:482], mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) [*J. Mol. Biol.* 48:443], mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444] o mediante de programas informáticos utilizando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package de, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o por programas informáticos de comparación BLAST NR o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos se determina comparando las dos secuencias alineadas de manera óptima en las que la secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos a comparar pueden tener adiciones o sustracciones en comparación con la secuencia de referencia para alineamientos óptimos entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones en las que el resto de aminoácido o nucleótido es idéntico entre las dos secuencias, preferentemente entre las dos secuencias completas, dividiendo el número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en el intervalo de alineación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

Por ejemplo, el programa BLAST, "secuencias BLAST 2" (Tatusova *et al.*, "secuencias Blast 2 - una nueva herramienta para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos", *FEMS Microbiol.*, 1999, Lett. 174:247-250) disponible en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf7bl2.html>, se puede utilizar con los parámetros por defecto (principalmente, para los parámetros "penalización por hueco abierto": 5, y "penalización por ampliación del hueco": 2; siendo la matriz seleccionada por ejemplo la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa); el programa calcula directamente el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar.

Para la secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos comprenden los que contienen la secuencia de referencia, determinadas modificaciones, en particular, una supresión, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En el caso de la sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos se reemplazan por aminoácidos "equivalentes". Aquí, la expresión "aminoácidos equivalentes" significa cualesquier aminoácidos susceptibles de ser sustituido por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar sin embargo las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y de los ejemplos específicos definidos a continuación.

Los aminoácidos equivalentes pueden determinarse bien en su homología estructural con los aminoácidos por los que están sustituidos o en los resultados de pruebas comparativas de actividad biológica entre los diversos anticuerpos que puedan generarse.

Como un ejemplo no limitativo, la tabla 1 a continuación resume las posibles sustituciones susceptibles de llevarse a cabo sin dar lugar a una modificación significativa de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente; sustituciones inversas son naturalmente posibles en las mismas condiciones.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

En una forma de realización específica, la presente invención se refiere a anticuerpos murinos, o a compuestos derivados o fragmentos funcionales de los mismos.

5 La presente divulgación se refiere asimismo a cualquier compuesto derivado de los anticuerpos tal como se describe en la invención.

Más particularmente, es divulgado en la presente memoria un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado por que dicho compuesto derivado consiste en una proteína de unión que comprende un andamiaje proteínico sobre el que se injerta por lo menos una CDR de tal manera que preserve la totalidad o parte de las propiedades de reconocimiento de parátos del anticuerpo inicial.

Pueden encontrarse presentes asimismo una o más secuencias de entre las secuencias de CDR descritas en la presente memoria sobre los diversos andamiajes proteínicos de inmunoglobulina. En este caso, la secuencia proteínica posibilita recrear un esqueleto peptídico que puede favorecer el plegado de las CDR injertadas, permitiendo que mantengan sus propiedades de reconocimiento de antígeno de parátos.

Generalmente, un experto en la materia conoce cómo determinar el tipo de andamiaje proteínico sobre el que injertar por lo menos una de las CDR que surgen del anticuerpo original. Más particularmente, resulta conocido que para ser seleccionados, dichos andamiajes deben cumplir el mayor número de criterios como se expone a continuación (Skerra A., J. Mol. Recog., 2000, 13:167-187):

- una buena conservación filogenética;
- 25 - una estructura tridimensional conocida (como, por ejemplo, mediante cristalografía, espectroscopia por RMN o cualquier otra técnica conocida por el experto en la materia);
- un tamaño pequeño;
- 30 - pocas modificaciones postranscripcionales o ninguna; y/o
- facilidad de producir, expresar y purificar.

El origen de dichos andamiajes proteínicos pueden ser, pero de manera no limitativa, las estructuras seleccionadas de entre: fibronectina y preferentemente el dominio de fibronectina de tipo III 10, lipocalina, anticalina (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 7484):257-75), la proteína Z que surge del dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, tiorredoxina A o proteínas con un motivo repetido tal como la "repetición anquirina" (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, nº 4, 1700-1705), la "repetición armadillo", la "repetición rica en leucina" y la "repetición de tetratricopéptido".

40 Deben mencionarse asimismo los andamiajes derivados de toxinas, tales como, por ejemplo, las toxinas de escorpiones, insectos, plantas, moluscos, etc., y los inhibidores de proteínas de la ON sintasa neuronal (PIN).

Un ejemplo, de una manera no limitativa, de dichas construcciones híbridas, es la inserción de CDR-H1 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-CD4, específicamente 13B8.2, en uno de los bucles en el PIN, preservando la nueva proteína de unión obtenida así las mismas propiedades de unión que el anticuerpo original (Bes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344). Sobre una base estrictamente ilustrativa, puede mencionarse asimismo la inserción de CDR-H3 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-lisozima VHH sobre uno de los bucles de neocarzinostatina (Nicaise et al., Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891).

50 Finalmente, como se describe anteriormente, dichos andamiajes peptídicos pueden comprender por lo menos una de las CDR que surgen del anticuerpo original. Preferentemente, pero sin resultar un requisito, un experto en la materia puede seleccionar por lo menos una CDR de la cadena pesada, resultando esto conocido como responsable principal para la especificidad del anticuerpo. La selección de una o más CDR relevantes resulta evidente para el experto en la materia, que selecciona a continuación las técnicas conocidas apropiadas (Bes et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74).

60 Está previsto un procedimiento para seleccionar un compuesto derivado de un anticuerpo según la invención, pudiendo dicho compuesto derivado inhibir la entrada de la célula de VIH *in vitro* y/o *in vivo* y comprendiendo dicho compuesto derivado un andamiaje peptídico sobre el que se injerta por lo menos una CDR de anticuerpo, comprendido dicho procedimiento las etapas siguientes:

- a) poner en contacto *in vitro* un compuesto que se compone de un andamiaje peptídico sobre el que se injerta por lo menos una CDR de anticuerpo con una muestra biológica que contiene VIH de tipo 1 y PBMC; y
- 65 b) seleccionar dicho compuesto si dicho compuesto puede inhibir la replicación de VIH-1,

y caracterizado por que dicha por lo menos una CDR injertada es seleccionada de entre las CDR siguientes de secuencia SEC ID nº 1 a 6 y 30 a 33 o una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 1 a 6 y 30 a 33.

5 Según un modo preferido, el procedimiento puede incluir en la etapa a) poner en contacto *in vitro* un compuesto que comprende un andamiaje peptídico sobre el que se injertan por lo menos dos o tres CDR de anticuerpo.

10 Según un modo todavía más preferido de este procedimiento, el andamiaje peptídico es seleccionado de entre andamiajes o proteínas de unión cuyas estructuras se han mencionado anteriormente.

15 Obviamente, estos ejemplos no son limitativos, y puede considerarse comprendida cualquier otra estructura conocida por o evidente para el experto en la materia por la protección proporcionada por la presente solicitud de patente.

20 La presente divulgación se refiere así a un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado por que el andamiaje peptídico es seleccionado de entre las proteínas que son a) bien preservadas filogenéticamente, b) de arquitectura robusta, c) con una organización molecular 3-D bien conocida, d) de un tamaño pequeño y/o e) que comprenden unas regiones que pueden ser modificadas por supresión y/o inserción sin modificar las propiedades de estabilidad.

25 Según una forma de realización preferida, el anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, está caracterizado por que dicho andamiaje peptídico es seleccionado de entre i) andamiajes que surgen de la fibronectina, preferentemente el dominio de la fibronectina de tipo 3 10, lipocalina, anticalina, la proteína Z que surge del dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, tiorredoxina A o proteínas con un motivo repetido tal como la "repetición de anquirina" (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, nº 4, 1700-1705), la "repetición armadillo", la "repetición rica en leucina" y la "repetición de tetratricopéptido" o iii) inhibidores proteínicos de la ON sintasa neuronal (PIN).

30 Otro aspecto de la invención se refiere a los fragmentos funcionales del anticuerpo descrito anteriormente.

35 Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo, o a sus fragmentos funcionales o compuestos derivados, caracterizado porque dicho fragmento funcional se selecciona entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media ha aumentado, tales como los fragmentos PEGilados.

40 Dichos fragmentos funcionales del anticuerpo según la invención consisten, por ejemplo, en los fragmentos Fv, scFv (sc = cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media ha aumentado por modificación química, tal como la adición de polialquilenglicol como por ejemplo polietilenglicol (PEGilación) (fragmentos PEGilados se conocen como Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG y Fab'-PEG), o por incorporación en un liposoma, microesferas o PLGA, dichos fragmentos poseen por lo menos una de las CDR características de los anticuerpos humanizados de la invención que puede ejercer especialmente de manera general actividad, incluso parcial, del anticuerpo de la que surge.

45 Preferentemente, dichos fragmentos funcionales comprenderán o incluirán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del que proceden, siendo suficiente dicha secuencia parcial para conservar la misma especificidad de fijación que el anticuerpo del que procede y afinidad suficiente, preferentemente por lo menos igual a 1/100, más preferentemente por lo menos 1/10 de la del anticuerpo de la que procede.

50 Dicho fragmento funcional contendrá por lo menos cinco aminoácidos, preferentemente 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 o 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo de la que procede.

55 Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán de los tipos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, que generalmente tienen la misma especificidad de fijación que el anticuerpo del que proceden. Según la presente invención, fragmentos de anticuerpo de la invención se pueden obtener a partir de los anticuerpos descritos anteriormente por procedimientos tales como digestión con enzimas, como por ejemplo pepsina o papaína, y/o por escisión de los puentes disulfuro por reducción química. Los fragmentos de anticuerpos también se pueden obtener por técnicas de genética recombinante también conocidas para un experto en la materia o por síntesis de péptidos por medio, por ejemplo, de los sintetizadores de péptidos automáticos tales como los comercializados por Applied Biosystems, etc.

60 Para más claridad, la tabla 2 a continuación resume las diversas secuencias de aminoácidos correspondientes a los anticuerpos de la invención.

Tabla 2 (en la que Mu = murino)

Anticuerpo	numeración de CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº	
515H7	IMGT		CDR-L1	1	
			CDR-L2	2	
			CDR-L3	3	
		CDR-L1		4	
		CDR-L2		5	
		CDR-L3		6	
	Kabat			CDR-L1	9
				CDR-L2	10
				CDR-L3	3
		CDR-L1			11
		CDR-L2			12
		CDR-L3			13
			Dominio variable Mu		7
	Dominio variable Mu			8	
301aE5	IMGT		CDR-L1	1	
			CDR-L2	2	
			CDR-L3	30	
		CDR-L1		31	
		CDR-L2		32	
		CDR-L3		33	
	Kabat			CDR-L1	9
				CDR-L2	36
				CDR-L3	37
		CDR-L1			38
		CDR-L2			39
		CDR-L3			40
			Dominio variable Mu		34
	Dominio variable Mu			35	

5 Un aspecto adicional importante particular de los anticuerpos objeto de la presente invención consiste en que no muestran unas funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

10 Más particularmente, como un ejemplo, los anticuerpos de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales de los mismos, no presentan afinidad por el FcγR (I, II o III) o por la C1q, o para ambos.

Estructuralmente, esto significa para el experto en la materia que los anticuerpos de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales de los mismos, están desprovistos de la porción Fc o su porción Fc no presenta una glicosilación correcta que permita conferir unas funciones efectoras.

15 Una consecuencia de esto consiste en que los anticuerpos de la invención son seleccionados preferentemente de entre isotipos IgG4 o IgG2, más preferentemente IgG4.

20 De manera similar, los fragmentos preferidos son fragmentos desprovistos de ADCC tales como fragmentos o diacuerpos de Fv, scFv (sc para la cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc, o cualquier fragmento cuya vida media podría ser aumentada mediante modificación química, tal como la adición de poli(alquilén) glicol tal como poli(etilén) glicol ("PEGilación") (fragmentos pegilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" para poli(etilén) glicol, o mediante la incorporación en un liposoma.

25 Más particularmente, un fragmento funcional preferido de la invención derivado del anticuerpo 515H7 es scFv, al que se hace referencia en adelante en la presente memoria como fragmento 515H7 scFv-Ck, comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 54.

La secuencia de nucleótidos que corresponde a dicho scFv comprende la secuencia SC ID nº 55.

30 Otro aspecto específico de la presente invención se refiere a anticuerpos híbridos, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizados por que dichos anticuerpos comprenden asimismo unas regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga con el ratón, particularmente el ser humano.

35 Todavía otro aspecto específico de la presente invención se refiere a anticuerpos humanizados, o sus compuestos

derivados o fragmentos funcionales, caracterizados por que las regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada derivadas del anticuerpo humano son, respectivamente la región lambda o kappa y la región gamma-2 o preferentemente gamma-4.

5 El anticuerpo de la invención comprende asimismo anticuerpos híbridos o humanizados.

Un anticuerpo híbrido es el que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadena pesada) procedente de un anticuerpo de una especie dada en combinación con regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga con respecto a dicha especie dada.

10 Los anticuerpos, o fragmentos híbridos de los mismos, se pueden preparar utilizando las técnicas de la genética recombinante. Por ejemplo, el anticuerpo híbrido puede ser producido por clonación de ADN recombinante que contiene un activador y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano de la invención, en particular murino, y una secuencia que codifica la región constante de anticuerpo humano. Un anticuerpo híbrido según la invención codificada por dicho gen recombinante podría ser, por ejemplo, un híbrido de ratón-humano, la determinándose la especificidad de este anticuerpo por la región variable procedente del ADN murino y su isotipo determinado por la región constante procedente del ADN humano. Consultar Verhoeyn *et al.* (*BioEssays*, 8:74, 1988) para los procedimientos para la preparación de anticuerpos híbridos.

20 La tabla 3 resume a continuación en la presente memoria las secuencias de aminoácidos de las diversas cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo híbrido 515H7 (al que se hace referencia como c515H7 o C515H7) según la invención.

Tabla 3 (en la que c= híbrido)

25

Anticuerpo c515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
Secuencias completas (sin péptido señal)	cVH (G4wt)	-	56
	cVH (G4PRO)	-	57
	cVH(G2wt)	-	58
	-	cVL-Ck	59

La secuencia de nucleótidos correspondiente a dichas cadenas pesadas SEC ID nº 56 a 58 y cadenas ligeras SEC ID nº 59 de anticuerpo c515H7 corresponden respectivamente a la secuencias SEC ID nº 60 a 63 (cadenas pesadas) y SEC ID nº 64 (cadena ligera).

30

En una forma de realización preferida, las secuencias de cadena pesada son eliminadas de su residuo de lisina C-terminal (como se ha descubierto en la serie de vector pConPlus original de Lonza: pConPlusy4ΔK, pConPlusy4PROΔk & pConPlusy2ΔK).

35 Además, la cadena pesada G4PRO corresponde a un isotipo de IgG4 humano portador de una mutación en la región bisagra para evitar la formación de semianticuerpos. Esta mutación se descubrió en pConPlusy4PROΔK a partir de Lonza [Angal S, King DJ, Bodmer MW, Turner A, Lawson AD, Roberts G, Pedley B, Adair JR. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Mol Immunol.*)1993; 30(1):105-108].

40

Más particularmente, la cadena pesada del anticuerpo híbrido comprende unas CDR homólogas a las CDR correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, en el que dichas CDR, según IMGT, consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden las secuencias respectivas SEC ID nº 4, 5 y 6.

45 Más particularmente, la cadena ligera del anticuerpo híbrido comprende unas CDR homólogas a las CDR correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, en la que dichas CDR, según IMGT, consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3.

50 Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo híbrido, o un fragmento funcional del mismo, caracterizado por que comprende unas cadenas pesada y ligera que presentan cada una unas CDR homólogas a las CDR correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, en el que dichas CDR, según IMGT, consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6, y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la cadena ligera que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3.

55

En otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo híbrido o un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de la secuencia que consiste en la SEC ID nº 8 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 7.

60

Todavía en otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo híbrido o un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 56, 57 o 58, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 59.

5 En una forma de realización preferida, el anticuerpo híbrido c515H7 VH(G4wt) / VL-Ck, o un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 56 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 59.

10 En una forma de realización preferida, el anticuerpo híbrido c515H7 VH(G4PRO) / VL-Ck, o un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 57, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 59.

15 En una forma de realización preferida, el anticuerpo híbrido c515H7 VH(G2wt) / VL-Ck, o un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 58, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 59.

20 "Anticuerpos humanizados" hace referencia a un anticuerpo que contiene unas regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, obteniéndose las otras partes de la molécula de anticuerpo a partir de uno (o varios) anticuerpo(s) humano(s). Además, algunos de los residuos de segmento de esqueleto (denominados FR) pueden ser modificados para conservar la afinidad de unión (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327, 1988).

25 Los anticuerpos humanizados de la invención o fragmentos de los mismos se pueden preparar por técnicas conocidas por un experto en la materia (tales como, por ejemplo, los descritos en los documentos Singer *et al.*, *J. Immun.*, 150:2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10:1-142, 1992; y Bebbington *et al.*, *Bio/Technology*, 10:169-175, 1992). Dichos anticuerpos humanizados se prefieren para su utilización en procedimientos que suponen diagnósticos *in vitro* o tratamiento preventivo y/o terapéutico *in vivo*. Otras técnicas de humanización, también conocidas para un experto en la materia, tales como, por ejemplo, la técnica de "injerto de CDR" descrita por PDL en las patentes EP 0451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 o US nº 5.530.101, US nº 6.180.370, US nº 5.585.089 y US nº 5.693.761. También pueden citarse las patentes US nº 5.639.641 o nº 6.054.297, nº 5.886.152 y nº 5.877.293.

35 Además, la invención se refiere asimismo a los anticuerpos humanizados procedentes del anticuerpo murino descrito anteriormente.

De una manera preferida, las regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada procedentes de anticuerpo humano son, respectivamente, la región lambda o kappa y la gamma-1, gamma-2 o preferentemente gamma-4.

40 Más específicamente, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado caracterizada por que comprende i) una región marco homóloga a la correspondiente región marco de una cadena pesada de anticuerpo humano, y ii) CDR homólogas a las correspondientes CDR de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, en las que dichas CDR, según el IMGT, consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6.

45 En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la secuencia que consiste en SEC ID nº 64.

50 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 67, 68 y 69.

55 Más específicamente, la invención se refiere a una cadena ligera de anticuerpo humanizado caracterizada por que comprende i) una región marco homóloga a la correspondiente región marco de una cadena ligera de anticuerpo humano, y ii) CDR homólogas a las CDR correspondientes de un anticuerpo procedente de una especie de mamífero diferente, en las que dichas CDR, según el IMGT, consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3.

60 En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena ligera de anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 65, 66, 82 u 83.

En todavía otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena ligera de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 70, 71, 84 u 85.

65 Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, o a un fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen cada una regiones i) regiones marco homólogas a las regiones marco correspondientes de un anticuerpo humano, y ii) CDR homólogas a las

correspondientes CDR de un anticuerpo procedente de una especie de mamífero diferente, en las que dichas CDR, según el IMGT, consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada que comprende respectivamente las secuencias SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6, y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la cadena ligera que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3.

5 En otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 64 y una región variable de la cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 65, 66, 82 u 83.

10 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere asimismo a un anticuerpo humanizado, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 67, 68 o 69 y una cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 70, 71, 84 u 85.

15 En una forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención, comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 67, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 70.

20 En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 68, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 70.

25 En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 69, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 70.

30 En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2.1-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 67, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 71.

35 En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2.1-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 68, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 71.

En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2.1-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 69, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 71.

40 En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2.2-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 67, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 84.

45 En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2.2-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 68, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 84.

50 En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2.2-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 69, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 84.

55 En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2.3-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 67, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 85.

En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2.3-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 68, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 85.

60 En otra forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2.3-Ck, o a un fragmento funcional del mismo, según la invención comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 69, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 85.

65 La tabla 4 resume a continuación en la presente memoria las secuencias de aminoácidos de los diversos dominios variables de cadenas pesada y ligera y longitud total (o completa) respectivamente, del anticuerpo humanizado 515H7 según la invención.

Tabla 4 (en la que Hz = humanizado)

Anticuerpo Hz515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
Dominios variables	VH1 d76N	-	64
	-	VL2	65
	-	VL2.1	66
	-	VL2.2	82
	-	VL2.3	83
Secuencias completas (sin péptido señal)	VH1 d76N (G4wt)	-	67
	VH1 D76N (G4PRO)	-	68
	VH! D76N (G2 wt)	-	69
	-	VL2-ck	70
	-	VL2.1-ck	71
	-	VL2.2-ck	84
	-	VL2.3-ck	85

5 En una forma de realización preferida, las secuencias de cadena pesada son eliminadas de su residuo de lisina C-terminal (como se descubre en las series de vector pConPLus original de Lonza: pConPLus γ 4 Δ K, pConPLus γ 4PRO Δ K & pConPLus γ 2 Δ K).

10 Además, la cadena pesada G4PRO corresponde a un isotipo IgG4 humano portador de una mutación en la región bisagra para evitar la formación de semianticuerpos. Esta mutación se descubre en pConPLus γ 4PRO Δ K parental de Lonza [Angal S, King DJ, Bodmer MW, Turner A, Lawson AD, Roberts G, Pedley B, Adair JR. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Mol Immunol.* (1993); 30(1):105-108].

15 Como un ejemplo, para evitar la duda, la expresión "VH1" es similar a las expresiones "Variante de VH 1", "variante de VH 1", "VH Var 1" o "VH var 1").

20 Debe entenderse que las combinaciones ejemplificados VH / VL anteriores no son restrictivas. El experto en la materia podría, por supuesto, sin carga excesiva y sin aplicación de habilidad creativa, reorganizar todas las VH y VL expuestas en la presente memoria.

Un aspecto novedoso de la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado caracterizado porque se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos (incluido cualquier código genético degenerado):

- 25 a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención;
- b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo de secuencias que consiste en SEC ID nº 14 a 19 y 41 a 45;
- 30 c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo de secuencias que consiste en SEC ID nº 21, 21, 46 y 47;
- d) los ácidos nucleicos de ARN correspondientes de los ácidos nucleicos como se define en b) o c);
- 35 e) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos como se define en a), b) y c); y
- f) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridarse en condiciones muy rigurosas con por lo menos una de las CDR de secuencia SEC ID nº 14 a 19 y 41 a 45.

40 La tabla 5 resume a continuación las diversas secuencias de nucleótidos que hacen referencia a los anticuerpos de la invención.

Tabla 5 (en la que Mu. = murino)

Anticuerpo	Numeración de CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº	
515H7	iMG T		CDR-L1	14	
			CDR-L2	15	
			CDR-L3	16	
		CDR-H1		17	
		CDR-H2		18	
	CDR-H3		19		
	KABAT			CDR-L1	22
				CDR-L2	23
				CDR-L3	16
		CDR-H1			24
		CDR-H2			25
CDR-H3			26		
		Dominio variable Mu.		20	
		Dominio variable Mu.		21	
301aE5	iMG T		CDR-L1	41	
			CDR-L2	15	
			CDR-L3	42	
		CDR-H1		43	
		CDR-H2		44	
	CDR-H3		45		
			CDR-L1	48	
KABAT			CDR-L2	49	
			CDR-L3	50	
	CDR-H1			51	
	CDR-H2			52	
	CDR-H3			53	
			Dominio variable Mu.		46
			Dominio variable Mu.		47

5 Las expresiones "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia polinucleotídica" y "secuencia nucleotídica", utilizada indistintamente en la presente descripción, significa una secuencia precisa de nucleótidos, modificados o no, que define un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene nucleótidos artificiales o no, y que es un ADN bicatenario, un ADN monocatenario o los productos de transcripción de dichos ADN.

10 También debe incluirse en la presente memoria que la presente invención no se refiere a secuencias nucleotídicas en su medio cromosómico natural, es decir, en un estado natural. Las secuencias de la presente invención se han aislado y/o purificado, es decir, se tomaron muestras directa o indirectamente, por ejemplo, mediante una copia, habiéndose modificado su medio por lo menos parcialmente. Los ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, por medio, por ejemplo, de células hospedadoras, u obtenidos por síntesis química también deben
15 mencionarse en la presente memoria.

"Secuencias nucleicas que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, después de la alineación óptima con una secuencia preferida" significa secuencias nucleicas que presentan, con respecto a la secuencia nucleico de referencia, determinadas modificaciones tales como, en particular, una supresión, un truncamiento, una extensión, una fusión híbrida y/o una sustitución, en particular
20 puntual. Preferentemente, estos son secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácidos que la secuencia de referencia, estando ésta relacionada con la degeneración del código genético, o secuencias de complementariedad que son probablemente para hibridarse específicamente con las secuencias de referencia, preferentemente en condiciones muy rigurosas, en particular las que se definen a continuación.

25 Hibridación en condiciones muy rigurosas significa que se seleccionan condiciones relacionadas con la temperatura y la fuerza iónica de tal manera que permiten que la hibridación se mantenga entre dos fragmentos de ADN complementarios. Sobre una base puramente ilustrativa, las condiciones muy rigurosas de la etapa de hibridación a fin de definir los fragmentos de polinucleótidos descritos anteriormente son ventajosamente las siguientes.

30 La hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) prehibridación a 42°C durante tres horas en tampón de fosfato (20 mM, pH 7,5) que contienen 5X SSC (1X SSC corresponde a una solución de NaCl 0,15 M + citrato de sodio 0,015 M), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 10X solución de Denhardt, 5% de sulfato de dextrano y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridación primaria durante 20 horas a una
35 temperatura en función de la longitud de la sonda (es decir: 42°C para una sonda > 100 nucleótidos de longitud)

seguido de dos lavados de 20 minutos a 20°C en 2X SSC + 2% de SDS, un lavado de 20 minutos a 20°C en 0,1 X SSC + 0,1% de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0,1 X SSC + 0,1% SDS durante 30 minutos a 60°C para una sonda > 100 nucleótidos de longitud. Las condiciones de hibridación muy rigurosas descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño definido se pueden adaptar por un experto en la materia para oligonucleótidos más largos o más cortos, según los procedimientos descritos en Sambrook, *et al.* (*Molecular Cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory, 3ª edición, 2001).

La invención comprende asimismo una molécula de ácido nucleico aislada caracterizada por que es seleccionada de entre los ácidos nucleicos siguientes:

- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica una cadena ligera de anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la invención;
- b) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica una cadena ligera de anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la invención;
- c) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la invención;
- d) un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico tal como se define en a), b) o c);
- e) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos que puede hibridar en condiciones muy severas con por lo menos una cadena ligera que comprende las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID nº 72 o 75 a 77;
- f) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos que puede hibridar en condiciones muy severas con por lo menos una cadena ligera que comprende las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID nº 73, 74, 86, 87 o 78, 79, 88, 89.

La tabla 6 resume a continuación las secuencias de nucleótidos de los diversos dominios variables de cadena ligeras y pesadas y la longitud total (o completa), respectivamente, del anticuerpo humanizado 515H7 según la invención.

Tabla 6 (en la que Hz = humanizado)

Anticuerpo Hz515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
Dominios variables	VH1 D76N	-	72
	-	VL2	73
	-	VL2.1	74
	-	VL2.2	86
	-	VL2.3	87
Secuencias completas (sin péptido señal)	VH1 D76N (G4wt)	-	75
	VH1 D76N (G4PRO)	-	76
	VH1 D76N (G2 wt)	-	77
	-	VL2-Ck	78
	-	VL2.1-Ck	79
	-	VL2.2-Ck	88
	-	VL2.3-Ck	89

La tabla 7 resume a continuación en la presente memoria las secuencias de nucleótidos de las diversas cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo híbrido 515H7 según la invención.

Tabla 7 (en la que c = híbrido)

Anticuerpo c515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
Secuencias completas (sin péptido señal)	cVH (G4wt)	-	60
	cVH (G4PRO)	-	61
	cVH(G2 wt)	-	62
	-	cVL-Ck	63

En otras palabras, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado, caracterizado por que es seleccionado de entre los ácidos nucleicos siguientes:

- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según la

invención;

- 5
- b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo de secuencias de CDR que consiste en SEC ID nº 14 a 19 y 41 a 45;
- c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo de secuencias de dominios variables de cadena pesada y ligera que consiste en SEC ID nº 20, 21, 46, 47, 72, 73, 74, 86 y 87;
- 10 d) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo de secuencias de cadenas pesadas y ligeras que consiste en SEC ID nº 60 a 63, 75 a 79, 88 y 89;
- e) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que consiste en SEC ID nº 55;
- 15 f) los ácidos nucleicos de ARN correspondientes de los ácidos nucleicos como se ha definido en b), c), d) o e);
- g) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos como se ha definido en a), b), c), d) y e); y
- 20 h) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos que pueden hibridar en condiciones muy severas con por lo menos una de las CDR de secuencias nº 14 a 19 y 41 a 45.

La invención también se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico como se describe en la invención.

25 La invención se refiere en particular a vectores de clonación y/o expresión que contienen dicha secuencia nucleotídica.

Los vectores de la invención contienen preferentemente elementos que permiten la expresión y/o la secreción de secuencias nucleotídicas en una célula hospedadora dada. El vector debe contener por lo tanto un activador, señales de iniciación y terminación de la traducción, así como regiones de regulación de la transcripción adecuadas. Deben poder mantenerse de manera estable en la célula hospedadora y, opcionalmente, pueden tener señales específicas que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes elementos son seleccionados y optimizados por un experto en la materia según la célula hospedadora utilizada. Con este objetivo, las secuencias nucleotídicas pueden insertarse en vectores autorreproductores en el anfitrión elegido o ser vectores integrantes del anfitrión elegido.

30

35

Dichos vectores se preparan por procedimientos normalmente utilizados por un experto en la materia y los clones resultantes pueden introducirse en un anfitrión adecuado por procedimientos habituales, tales como la lipofección, electroporación, choque térmico o procedimientos químicos.

40 Los vectores son, por ejemplo, vectores de plásmido o de origen vírico. Se utilizan para transformar células hospedadoras con el fin de clonar o expresar las secuencias nucleotídicas de la invención.

La invención también comprende células hospedadoras transformadas por un vector o que comprende el mismo como se describe en la presente invención.

45

La célula hospedadora puede seleccionarse entre sistemas procariontes o eucariotes, tales como células bacterianas, por ejemplo, pero también células de levadura o células animales, células en particular de mamíferos. También se pueden utilizar células de insectos o de plantas.

50 La invención también se refiere a los animales, aparte del hombre, que tienen células transformadas según la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un anticuerpo según la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

55

- a) el cultivo en un medio de células hospedadoras y las condiciones de cultivo adecuadas para las mismas según la invención, y
- 60 b) la recuperación de dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos de este modo en el medio de cultivo o a partir de dichas células cultivadas.

Las células transformadas según la invención se utilizan en procedimientos para la preparación de polipéptidos recombinantes según la invención. Los procedimientos para la preparación de polipéptidos según la invención en forma recombinante, caracterizados porque dichos procedimientos utilizan un vector y/o una célula transformada por un vector según la invención, también están comprendidos en la presente invención. Preferentemente, una célula transformada por un vector según la invención se cultiva en condiciones que permiten la expresión del polipéptido

65

mencionado anteriormente y la recuperación de dicho péptido recombinante.

Como ya se ha mencionado, la célula hospedadora se puede seleccionar entre los sistemas procariotas o eucariotas. En particular, es posible identificar las secuencias nucleotídicas de la invención que facilitan la secreción en dicho sistema procariota o eucariota. Un vector según la invención que lleva dicha secuencia puede utilizarse por lo tanto ventajosamente para que se segregue la producción de proteínas recombinantes. De hecho, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés se verá facilitada por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular en vez de en el interior de células hospedadoras.

Los polipéptidos de la invención también se pueden preparar por síntesis química. Uno de dichos procedimientos de preparación es también objeto de la presente invención. Un experto en la materia conoce procedimientos para la síntesis química, tales como técnicas de fase sólida (véase en particular Steward *et al.*, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2^a ed.) o técnicas en fase sólida parcial, por condensación de fragmentos o por síntesis convencional en solución. Los polipéptidos obtenidos por síntesis química y que pueden contener los correspondientes aminoácidos artificiales también están comprendidos en la presente invención.

Los anticuerpos, o los fragmentos funcionales de los mismos, susceptibles de ser obtenidos por el procedimiento de la invención también están comprendidos en la presente invención.

Según todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos como se describieron anteriormente, caracterizados por que además pueden unirse específicamente a un receptor de la familia de quimiocinas humanas y/o capaz de inhibir específicamente la replicación del VIH X4-trópico.

Según todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos como se han descrito anteriormente, caracterizados por que pueden, además, unirse específicamente a un receptor de la familia de las citocinas humanas y/o inhibir específicamente la replicación de VIH X4/R5-trópico.

La presente exposición se refiere a anticuerpos, o a sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que constan de un anticuerpo que son biespecíficos en el sentido de que comprenden un segundo motivo capaz de interactuar con cualquier receptor implicado en la entrada celular del VIH, tales como, por ejemplo, CCR5, CD4 CXCR4 (otro aparte del anticuerpo de la presente invención, es decir, dirigido a otro epítipo), O CCR3, CCR2, CCR8, CXCR6, CXCR7, CX3CR1.

Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales constituyen una segunda generación de anticuerpos monoclonales en los que dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula (Hollinger y Bohlen, 1999, *Cancer and metastasis*, rev. 18:411-419). Su utilidad se demostró tanto en dominios de diagnóstico como terapéuticos con relación a su capacidad para recuperar nuevas funciones efectoras o para dirigir varias moléculas a la superficie de las células tumorales; dichos anticuerpos se pueden obtener por procedimientos químicos (Glennie M.J. *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139, 2367-2375; Repp R. *et al.*, 1995, *J. Hemat.*, 377-382) o procedimientos somáticos (Staerz U.D. y Bevan M.J., 1986, *PNAS* 83, 1453-1457; Suresh M.R. *et al.*, 1986, *Method Enzymol.*, 121:210-228), pero también, preferentemente, por técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y por lo tanto facilitar la purificación del anticuerpo buscado (Merchand *et al.*, 1998, *Nature Biotech.*, 16:677-681).

Estos anticuerpos biespecíficos pueden considerarse IgG entera, Fab'2 biespecífico, Fab'PEG, diacuerpos o scFv biespecífico, pero también un anticuerpo biespecífico tetravalente en la que dos lugares de fijación están presentes por cada antígeno específico (Park *et al.*, 2000, *Mol. Immunol.*, 37 (18): 1123-1130) o los fragmentos de los mismos como se describió anteriormente.

Además de una ventaja económica dado que la producción y administración de un anticuerpo biespecífico son más económicas que la producción de dos anticuerpos específicos, la utilización de dichos anticuerpos biespecíficos tiene la ventaja de reducir la toxicidad del tratamiento. De hecho, la utilización de un anticuerpo biespecífico permite disminuir la cantidad global de anticuerpos circulantes y, por consiguiente, la posible toxicidad.

Preferentemente, los anticuerpos biespecíficos son unos anticuerpos bivalentes o tetravalentes.

Por último, la presente invención se refiere a los anticuerpos descritos anteriormente, o a uno de sus fragmentos funcionales, como un medicamento.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados. Preferentemente, dicho anticuerpo se complementa con un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a la composición como se ha descrito anteriormente como un medicamento.

En un aspecto particular de la invención, el anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, inhibe la replicación de aislado primario KON de VIH-1 en las PBMC con una IC₉₀ de por lo menos 5µg/ml, preferentemente por lo menos 10

µg/ml.

La presente invención comprende asimismo la utilización de un anticuerpo o la composición según la invención para la preparación de un fármaco y/o medicamento para la prevención o el tratamiento de la infección por VIH.

Más particularmente, como un ejemplo no limitativo, dicha infección por VIH es una infección por VIH X4-trópico.

En otra forma de realización, como un ejemplo no limitativo, dicha infección por VIH es una infección por VIH X4/R5-trópico.

La presente invención se refiere asimismo a la utilización de un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, preferentemente humanizado, y/o de una composición según la invención para la preparación de un fármaco para inhibir la replicación de VIH. Generalmente, la presente invención se refiere a la utilización de un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, preferentemente humanizado, y/o de una composición, para la preparación de un fármaco para la prevención o el tratamiento de una enfermedad por VIH.

En la presente descripción, "vehículo farmacéutico" significa un compuesto, o una combinación de compuestos, que se introducen en una composición farmacéutica que no causa reacciones secundarias y que, por ejemplo, facilita la administración de los principios activos, aumenta su vida útil y/o la eficacia en el organismo, aumenta su solubilidad en solución o mejora su almacenamiento. Dichos vehículos farmacéuticos son bien conocidos y un experto en la materia los adaptará según la naturaleza y la vía de administración de los principios activos seleccionados.

Preferentemente, dichos compuestos se administrarán por vía general, en particular por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, intravaginal u oral. Más preferentemente, la composición compuesta por el anticuerpo según la invención se puede administrar en varias dosis espaciadas por igual a lo largo del tiempo.

Sus vías de administración y regímenes de dosificación y formas galénicas óptimas se pueden determinar según los criterios generalmente tenidos en cuenta al establecer un tratamiento adecuado para el paciente, tales como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, su la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios experimentados.

La invención se refiere asimismo a una composición que comprende, además, como producto de combinación para la utilización de una manera simultánea, separada o prolongada, un anticuerpo anti-VIH o un anticuerpo antientrada celular de VIH o un anticuerpo antirreplicación de VIH diferente al anticuerpo dirigido contra CXCR4.

Según todavía otra forma de realización, la presente invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente que comprende por lo menos un segundo compuesto anti-VIH seleccionado de entre los compuestos que pueden inhibir específicamente la entrada de VIH y/o la replicación tal como los compuestos anti-CCR5, anti-CD4 y compuestos anti-CXCR4 diferentes a los descritos en la presente invención, o cualquier otro compuesto conocido por el experto en la materia.

Otra forma de realización complementaria de la invención consiste en una composición como se ha descrito anteriormente comprendida por, además, como una combinación o producto de conjugación para la utilización simultánea, aparte o prolongada, un compuesto anti-VIH.

"Utilización simultánea" significa la administración de ambos compuestos de la composición comprendidos en una forma farmacéutica única.

"Utilización aparte" significa la administración, al mismo tiempo, de ambos compuestos de la composición, comprendidos en formas farmacéuticas distintas.

"Utilización prolongada" significa la administración sucesiva de ambos compuestos de la composición, incluido cada uno en una forma farmacéutica distinta.

Generalmente, la composición según la invención aumenta considerablemente la eficacia del tratamiento del VIH. En otras palabras, el efecto terapéutico del anticuerpo de la invención mejora de una manera inesperada por la administración de un agente anti-VIH. Otra ventaja importante posterior producida por una composición de la invención se refiere a la posibilidad de utilizar dosis eficaces más bajas del principio activo, por lo que es posible evitar o reducir los riesgos de la aparición de efectos secundarios, en particular, el efecto del agente anti-VIH. Por otra parte, esta composición permite conseguir el efecto terapéutico esperado más rápidamente.

"Agente terapéutico anti-VIH" significa una sustancia que, cuando se administra a un paciente, trata o previene la replicación del VIH en el paciente. Ejemplos no restrictivos de dichos agentes comprenden "fármacos antirretrovirales tales como inhibidores de la proteasa de VIH (PI), inhibidores de la transcriptasa inversa de VIH nucleotídicos (NRTI/NtRTI), inhibidores de la transcriptasa inversa de VIH no nucleosídicos, inhibidores de la entrada

de VIH, inhibidores de la integrasa de VIH”.

Dichos agentes, por ejemplo, se citan en VIDAL, en la páginas dedicadas a los compuestos relacionados con los “compuestos anti-VIH”; los compuestos anti-VIH mencionados como referencia a este documento son mencionados en la presente memoria como agentes anti-VIH preferidos no limitativos.

Un inhibidor de la proteasa de VIH se refiere a cualquier sustancia que puede inhibir la actividad de la proteasa de VIH. Los ejemplos de dichos inhibidores de la proteasa de VIH incluyen de manera no limitativa mesilato de Saquinavir o SQV (Invirase®), Indinavir o IDV (Crixivan®), Ritonavir o RTV (Norvir®), Nelfinavir o NFV (Viracept®), Amprenavir (Agenerasa®, Prozei®), Lopinavir/ritonavir o LPV/r (Kaletra®, Aluvia®), Atazanavir o ATV (Reyataz®), Zivada®), Fosamprenavir o FPV (Lexiva®, Telzir®), Tipranavir o TPV (Aptivus®), Darunavir o DRV (Prezista®).

Un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleotídico o nucleosídico de VIH (NRTI) se refiere a una sustancia que es un análogo de nucleótido o nucleósido que bloquea la transcripción inversa del ARN de VIH. Los ejemplos de NRTI incluyen de manera no limitativa Zidovudina o AZT,ZDV (Retrovir/combivir/trixivir®), Didanosina o ddi (Videx®), Zalcitabina (HIVID®), Stavudina o d4T (Zerit®), Lamivudina o 3TC (Epivir/combivir/epzicom/trixivir®), Abacavir o ABC (Ziagen/trixivir/epzicom®), Tenofovir disoproxil fumarato o TDF (Viread/atripla/truvada®), Emtricitabina o FTC (Emtriva/atripla/truvada®).

El inhibidor de la transcriptasa inversa de VIH no nucleosídico (NNRTI) se refiere a una sustancia que no es un análogo nucleotídico o nucleosídico que bloquea la transcripción inversa del ARN de VIH. Los ejemplos de NNRTI incluyen de manera no limitativa Nevirapina o NVP (Viramune®), Efavirenz o EFV (Sustiva/atripla®, Stocrin®), Delavirdine o DLV (Rescriptor®) y Etravirina o ETR (Intelence®).

Un inhibidor de la entrada de VIH se refiere a una sustancia que bloquea la entrada celular de VIH. Los ejemplos de inhibidores de entrada de VIH incluyen de manera no limitativa Enfuvirtida o T20 (Fuzeon®), Maraviroc o MVC (Celsentri®, Celzentry®).

El inhibidor de la integrasa de VIH se refiere a una sustancia que inhibe la actividad de la integrasa de VIH. Un ejemplo de inhibidor de la integrasa incluye de manera no limitativa Raltegravir o RAL (Isentress®).

Dichos agentes, por ejemplo, son asimismo compuestos que pertenecen a la misma clase de fármacos descritos en VIDAL, que se encuentran en la actualidad en los ensayos clínicos tales como, pero no limitados a, Vicriviroc, PRO140, TNX-355, AMD070, Racivir, Apricitabina, Elvucitabina, Flosalvudina, Rilpivirina, Elvitegravir.

Dichos agentes, por ejemplo, son asimismo compuestos que pertenecen a otras clases potenciales de fármacos tales como, pero no limitados a, inhibidores de maduración (Bevirimat), análogos de glucósido de b-galactosil-ceramida, agentes de unión a carbohidratos, inhibidores de RNaseH, inhibidores de la expresión génica de VIH, estimuladores de la liberación de VIH a partir de linfocitos T latentes (ácido valproico...).

En una forma de realización particularmente preferida, dicha composición de la invención como un producto de combinación está caracterizada por que dicho agente anti-VIH está ligado químicamente a dicho anticuerpo para la utilización simultánea.

Con el fin de facilitar la unión entre dicho agente anti-VIH y dicho anticuerpo, pueden ser introducidas unas moléculas separadoras entre los dos compuestos que se deben unir, tal como el poli(alquilen)glicol polietilenglicol o los aminoácidos; o, en otra forma de realización, pueden utilizarse dichos derivados activos de agentes anti-VIH, en los que se han introducido las funciones que pueden reaccionar con dicho anticuerpo. Estas técnicas de unión resultan bien conocidas por el experto en la materia y no se expondrán con mayor detalle en la presente descripción.

Preferentemente asimismo, dicho anticuerpo que forma dicho conjugado es seleccionado de entre sus fragmentos funcionales, particularmente los fragmentos que han perdido su componente Fc, tales como los fragmentos de scFv.

La invención se refiere asimismo a una composición como un producto de combinación o a un conjugado de fármaco anti-VIH/Mab anti-CXCR4, según la invención, utilizado como un fármaco.

Preferentemente, dicha composición como un producto de combinación o dicho conjugado serán suplementados con un vehículo farmacéutico y/o excipiente.

Por lo tanto, la invención se refiere a la utilización de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, para la preparación de un fármaco para el reconocimiento específico de un compuesto que es biológicamente activo para la replicación de VIH.

Como se ha demostrado anteriormente, los Mab de CXCR4 515H7 y 301aE5 tienen fuertes actividades contra la replicación de VIH-1 en las PBMC, por lo que dichos anticuerpos podrían utilizarse en ensayos de cribado para la

identificación de agentes antivirales antagonistas de CXCR4 destinados a tratar la infección por VIH-1. En la primera etapa de estos ensayos, las células que expresan CXCR4 se incuban con los Mab 515H7 y/o 301aE5 y a continuación, se pueden determinar el potencial de las moléculas para inhibir la fijación de los Mab 515H7 y/o 301aE5. Las células utilizadas en este tipo de ensayos pueden ser estirpes celulares transfectadas tales como CHO-CXCR4, NIH3T3-CXCR4 o estirpes celulares humanas transfectadas con CXCR4 tales como U373-MAGI-CXCR4, estirpes celulares humanas que expresan CXCR4 tales como NALM6 o células primarias tales como PBMC. El procedimiento utilizado para detectar antagonistas de Mab 515H7 y/o 301aE5 que inhiben CXCR4 que se unen a células que expresan CXCR4 puede ser el ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA) competitivo a base de células como describe Zhao Q. *et al. (AIDS Research And Human Retroviruses, 2003, 19, págs. 947-955)* o los protocolos que utilizan clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), tal como se describe en Juárez J. *et al. (Leukemia 2003, 17, págs. 1294-1300)*.

Por lo tanto, en un aspecto particular de la invención, se considera un procedimiento para la detección y/o la identificación de moléculas como agentes antivirales antagonistas de CXCR4 que comprende las etapas siguientes:

- a) seleccionar las células que expresan CXCR4,
- b) incubar dichas células con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, de la invención, y
- c) evaluar las moléculas sometidas a ensayo para su inhibición de la unión entre el anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales a CXCR4, y
- d) seleccionar moléculas capaces de dicha inhibición.

En otra forma de realización particular, puede añadirse la etapa e) siguiente:

- e) someter a ensayo estas moléculas en un ensayo de replicación de VIH-1.

Otras características y ventajas de la invención aparecerán además en la descripción con los ejemplos y figuras cuyas leyendas se presentan a continuación.

Leyendas de las figuras

Las figuras 1A y 1B representan la estrategia de activación ("gating") para la expresión de CXCR4 en los monocitos y linfocitos.

La figura 1A: tinción de los linfocitos T con el anticuerpo CD3-PE.

La figura 1B: tinción de los monocitos con el anticuerpo CD14-PE.

Las figuras 2A y 2B representan la unión de los Mab anti-CXCR4 515H7 y 301aE5 en los monocitos y los linfocitos T.

Las figuras 3A y 3B representan la modulación del dímero del receptor CXCR4 mediante SDF-1 y los Mab anti-CXCR4 515H7 y 301aE5, respectivamente, mediante un enfoque de transferencia de energía por resonancia bioluminiscente (BRET) en las células HEK293.

Las figuras 4A y 4B y la figura 5 representan la capacidad de los Mab anti-CXCR4 515H7 y 301aE5 para inhibir la replicación del aislado de VIH-1 KON (virus X4) en las PBMC humanas.

Las figuras 6A, 6B y 6C representan la inhibición de la liberación de calcio inducida por SDF-1 en las células CHO-CXCR4 mediante los Mab 515H7 (figura 6A), 301aE5 (figura 6B) y c515H7 (figura 6C).

Las figuras 7 y 8 representan la capacidad de los Mab anti-CXCR4 515H7, c515H7 y 301aE5 para inhibir la replicación de los aislados primarios MN del virus X4 de VIH-1 (figura 7) y 92UG024 (figura 8) en las PBMC humanas.

La figura 9 representa la capacidad de los Mab anti-CXCR4 515H7, c515H7 y 301aE5 para inhibir la replicación de los aislados primarios del virus X4 de VIH-1 KON, MN y 92UGO24 en las PBMC humanas.

Las figuras 10 y 11 representan la capacidad de los Mab anti-CXCR4 515H7, c515H7 y 301aE5 para inhibir la replicación del aislado primario 89.6 del virus X4/R5 del VIH-1 en las PBMC humanas.

La figura 12 representa el efecto beneficioso de combinar el Mab c515H7 con Maraviroc para inhibir la replicación del aislado primario 89.6 (virus X4/R5 dual) del VIH-1 en las PBMC humanas.

La figura 13 representa el efecto beneficioso de combinar el Mab c515H7 con Maraviroc para inhibir la replicación del aislado primario UG93067 (virus dual X4/R5) del VIH-1 en las PBMC humanas.

5 La figura 14 representa la capacidad de los Mab anti-CXCR4 515H7, c515H7 y 301aE5 para inhibir la replicación del aislado primario KON del virus X4 de VIH-1 en las PBMC.

La figura 15 ilustra la especificidad de unión del Mab c515H7 mediante análisis FACS.

10 La figura 16 ilustra el efecto del Mab c515H7 sobre el homodímero de CXCR4, mediante un enfoque de transferencia de energía por resonancia bioluminiscente (BRET).

15 La figura 17: Alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada 515H7 con las estirpes germinativas humanas IGHV3-49*04 e IGHJ4*01. La secuencia de aminoácidos VH de 515H7 está alineada con las secuencias marco del aceptador humano seleccionado. Las secuencias de VH Var1 (VH1) corresponden a las variantes humanizadas de los dominios VH de 515H7. La retromutación simple en la posición 76 está representada en negrita.

20 La figura 18: Alineación de secuencias de aminoácidos de la cadena ligera 515H7 con las estirpes germinativas humanas IGKV4-1*01 e IGKJ1*01. La secuencia de aminoácidos VL de 515H7 está alineada con las secuencias marco del aceptador humano seleccionado. Las secuencias VL Var2.1, Var2.2 y Var2.3 corresponden a variantes humanizadas construidas de VL Var2 de 515H7 humanizadas, con restos mutados en negrita. Var2.1 y Var2.2 portan 4 residuos más humanizados mientras que Var2.3 contiene 5 residuos más humanos.

25 La figura 19: Bloqueo transversal del anticuerpo 515H7 murino biotinilado por el híbrido 515H7 y las diferentes variantes del 515H7 humanizado. La actividad de las variantes humanizadas de 515H7 (hz515H7) para bloquear transversalmente el anticuerpo 515H7 murino original se determinó por citometría de flujo utilizando células NIH3T3 transfectadas con CXCR4. La actividad de las variantes humanizadas se comparó con el 515H7 híbrido. La actividad de bloqueo transversal de la variante VH1 combinada con el VL híbrido (cVL) fue muy similar a la del híbrido (A). No se determinó ninguna reducción en la actividad de la variante 1 de VH (VH1, variante sin retromutaciones) cuando se combina con la variante 2 de VL (B).

35 La figura 20: Inhibición de la unión del SDF-1 biotinilado mediante el 515H7 híbrido y las variantes diferentes del 515H7 humanizado. La capacidad de la variante humanizada de 515H7 (hz515H7) para inhibir la unión de SDF-1 se evalúa mediante citometría de flujo utilizando la estirpe celular RAMOS. La capacidad de inhibición de las variantes humanizadas es comparada con el 515H7 humanizado. La variante humanizada hz515H7 VH1 D76N VL2 presenta una capacidad similar para inhibir la unión de SDF-1 al anticuerpo híbrido. El fragmento de anticuerpo humanizado hz515 VH1 VL2 resulta totalmente activo en la inhibición de la unión de SDF-1 a las células RAMOS.

40 La figura 21 representa la unión específica de los Mab 515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2 y hz515H7 VH1 D76N VL2.3) a CXCR4 en NIH3T3-CXCR4.

45 La figura 22 representa el efecto de los Mab 515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2 y hz515H7 VH1 D76N VL2.3) sobre el homodímero de CXCR4 mediante un enfoque de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET).

Ejemplos

50 Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales (Mab) contra CXCR4 humano

Para generar anticuerpos monoclonales contra CXCR4, se inmunizaron ratones Balb/c con células NIH3T3-CXCR4 recombinantes y/o péptidos correspondientes a CXCR4 extracelular N-terminales y bucles. Se inmunizaron una vez ratones de 6-16 semanas de la primera inmunización, con antígeno en adyuvante completo de Freund por vía subcutánea (sc), seguido de 2 a 6 inmunizaciones con antígeno en adyuvante incompleto de Freund sc. La respuesta inmunitaria se controló por extracciones de sangre retro-orbitales. El suero se identificó por ELISA (como se describe a continuación) y los ratones con los valores más altos de anticuerpos anti-CXCR4 se utilizaron para fusiones. Los ratones se revacunaron por vía intravenosa con antígeno dos días antes de sacrificio y la extirpación del bazo.

60 - ELISA

Para seleccionar los ratones productores de anticuerpos anti-CXCR4, se analizaron por ELISA sueros de ratones inmunizados. En resumen, las placas de microvaloración se recubrieron con péptido N-terminal purificado [1-41] conjugado a BSA en 5 µg de péptido equivalente/ml, 100 µl/pocillo se incubaron a 4°C durante la noche, a continuación se bloquearon con 250 µl/pocillo de 0,5% de gelatina en PBS. Se añadieron a cada pocillo diluciones de plasma de ratones inmunizados con CXCR4 y se incubaron 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron con PBS y

después se incubaron con un anticuerpo de IgG anti-ratón en cabra de anticuerpos conjugado con HRP (Jackson Laboratories) durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, las placas se revelaron con sustrato TMB, se detuvo la reacción 5 minutos después mediante la adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 M. Los ratones que desarrollaron los valores más altos de anticuerpos anti-CXCR4 se utilizaron para la generación de anticuerpos.

- Generación de hibridomas productores de Mab contra CXCR4

Los esplenocitos de ratón, aislados de un ratón BALB/c que desarrollaron los valores más altos de anticuerpos anti-CXCR4 se fusionan con PEG a una estirpe celular SP2/O de mieloma de ratón. Las células se colocaron en placas a razón de aproximadamente 1×10^5 /pocillo en placas de microvaloración seguido de dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene medio de cultivo ultra + L-glutamina 2 mM + piruvato sódico 1 mM + 1 x HAT. Los anticuerpos IgG monoclonales anti-CXCR4 en los pocillos se identificaron a continuación por ELISA. Los hibridomas que segregan anticuerpos se subclonaron a continuación, por lo menos dos veces limitando la dilución, se cultivaron *in vitro* para generar anticuerpos para su posterior análisis.

Ejemplo 2: Caracterización de la especificidad de unión de Mab anti-CXCR4 515H7 y 301aE5 (NIH3T3-hCXCR4 transfectante) mediante análisis FACS.

En este experimento, se examinó por análisis FACS la fijación específica a CXCR4 humano (hCXCR4) de Mab 515H7 y 301aE5 anti-CXCR4.

Unas células transfectadas NIH3T3 y NIH3T3-hCXCR4 se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpos monoclonal 515H7 y 301aE5. Las células se lavaron después con 1% de BSA/PBS/0,01% de NaN₃. A continuación, se añadieron a las células anticuerpos secundarios marcados con Alexa y se dejaron incubar a 4°C durante 20 min. Las células después se volvieron a lavar dos veces. Tras el segundo lavado, se realizó un análisis FACS. Los resultados de estos estudios de fijación a receptores se proporcionan en la siguiente Tabla 8, que demuestra [intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida por FACS] que los Mab 515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 se une específicamente a la estirpe celular transfectada CXCR4-NIH3T3 humana mientras que no hubo reconocimiento en las células NIH3T3 originales.

Tabla 8

	NIH3T3 (MFI)	NIH3T3-CXCR4 (MFI)
clon 515H7 (10 µg/ml)	16	2752
clon 301aE5 (10 µg/ml)	21	1367

Ejemplo 3: Caracterización de la unión de Mab anti-CXCR4 515H7 y 301aE5 a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante análisis FACS.

Se recoge sangre como una capa leucocítica de un donante sano. Se incuban 100 µl de sangre completa con anticuerpos anti-CXCR4 humano (clones 515H7 y 301aE5) a la concentración adecuada durante 20 minutos a 4°C. La sangre se lava tres veces en PBS-BSA 1%-NaN₃ 0,01% y se incuba con IgG 488 Alexa antihumana de cabra diluida 1:500 (Invitrogen) durante 20 minutos a 4°C. Las células a continuación se lavan e incuban con CD14-Pe (Caltag) o CD3-PE (Caltag) durante 10 minutos a 4°C y se lavan tres veces. Los glóbulos rojos se lisan con una disolución de lisado de alto rendimiento (Caltag) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se analizan inmediatamente utilizando Facscalibur (Becton-Dickinson). La expresión del CXCR4 en los monocitos se realiza en las células positivas CD14 y la expresión en el linfocito T se realiza en las células CD3 positivas (figura 1). Los resultados se expresan en la capacidad de unión al antígeno (ABC).

Como se representa en las figuras 2A y 2B, los clones anti-CXCR4 humano 515H7 y 301aE5 tiñen los linfocitos T (figura 2A) y los monocitos (figura 2B) indicando que los Mab 515H7 y 301aE5 pueden reconocer la forma natural del CXCR4 expresada en la superficie celular de los monocitos y los linfocitos T.

Ejemplo 4: Efecto de los Mab 515H7 y 301aE5 sobre el homodímero de CXCR4, mediante un enfoque de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET).

Este análisis funcional permite determinar los cambios de configuración inducidos tras la fijación de SDF-1 y/o Mab 515H7 al receptor CXCR4 al nivel de la formación del homodímero de CXCR4.

Para las parejas de interacción investigadas se construyeron vectores de expresión como proteínas de fusión con el colorante correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, Rluc y proteína fluorescente amarilla, YFP) aplicando técnicas de biología molecular convencionales. Dos días antes de realizar los experimentos BRET, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con vectores de expresión que codifican las correspondientes parejas BRET: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4. Al día siguiente, las células se

distribuyeron en placas 96 MW blancas recubiertas anteriormente de polilisina en medio de cultivo completo [DMEM enriquecido con FBS al 10%]. Las células se cultivaron en primer lugar a 37°C con CO₂ al 5% a fin de permitir la fijación de las células a la placa. Las células murieron a continuación por inanición con 200 µl de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento BRET, se retiró DMEM y las células se lavaron rápidamente con PBS. Las células se incubaron a continuación en PBS en presencia o ausencia de anticuerpo, 10 min a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 µM con o sin SDF-1 300 nM en un volumen final de 50 µl. Después de la incubación durante 10 minutos más a 37°C, se inicia la absorción de la emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el lector Multilabel Mithras LB940 (Berthold) (1s/longitud de onda/pocillo repetido 15 veces a temperatura ambiente).

El cálculo de la relación de BRET se realizó como se ha descrito anteriormente (Angers *et al.*, 2000.): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times Cf] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, donde $Cf = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para las células que expresan la proteína de fusión Rluc sola en las mismas condiciones experimentales. Simplificando esta ecuación demuestra que la relación BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando las dos parejas BRET están presentes, corregida por la relación 530/485 nm obtenida en las mismas condiciones experimentales, sólo cuando la pareja fusionada a Rluc está presente en la ensayo. Para facilitar la lectura, los resultados se expresan en unidades miliBRET (mBU); mBU corresponde a la relación BRET multiplicada por 1000.

SDF1 (300 nM) aumentó aproximadamente un 20% la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas adaptadoras y aceptadoras fusionadas al receptor CXCR4, es probable que indique formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o cambios de configuración de dímeros preexistentes (figuras 3A y B). Los Mab 515H7 y 301aE5 pueden modular los cambios de configuración provocados por SDF-1 para homodímeros CXCR4 (69% de inhibición de aumento BRET provocado por SDF-1 para 515H7 y 301aE5, figuras 3A y B). Los Mab 515H7 y 301aE5 pueden asimismo modular por sí mismos la proximidad espacial indicando una influencia de Mab 515H7 y 301aE5 sobre la configuración del homodímero CXCR4/CXCR4 (figuras 3A y 3B).

Ejemplo 5: Inhibición de la replicación de aislado primario KON (virus X4) de VIH-1 en PBMC humanas mediante los Mab anti-CXCR4 515H7 y 301aE5

Son aisladas las PBMC de donantes normales seronegativos respecto el VIH-1 a partir de capas leucocíticas o citaféresis mediante una centrifugación de gradiente Ficoll-Hypaque. Las PBMC son activadas en presencia de PHA en un medio de cultivo celular RPMI 1640 que contiene 25 mM de HEPES, 5 ml de penicilina (10000 U/ml) - estreptomycin (10000 µg/ml) 2nM de L-glutamina, suplementado con 10% de FCS inactivado por calor y son utilizadas como dianas celulares en un ensayo de neutralización de ciclo único. La replicación del VIH-1 en las PBMC humanas primarias se realiza analizando la tinción intracelular del antígeno p24 viral mediante un análisis FACS. En resumen, son incubados 25 µl por pocillo de varias diluciones de Mab 515H7, 301aE5 y 12G5 (R&D Systems) o es incubado un medio de cultivo como control (RPMI 1640, FCS al 10%, IL-2 al 0,1%) durante 1 hora a 37°C con 25 µl por pocillo de una dilución de aislado primario KON X4 de VIH-1, en duplicado. Se añaden las PBMC humanas PHA-activadas (25 µl/pocillo) a 20 x 10⁶ células/ml a la mezcla Mab/virus en una placa de 96 pocillos (U-bottom, Costar 3599) y se cultivan durante 24 a 36 horas a 37°C en RPMI 1640 con FCS al 10% e IL-2 al 0,1%. Es introducido un control que consiste en PBMC no infectadas en un medio sin Mab. Para detectar las PBMC infectadas por VIH, la tinción intracelular del antígeno p24 viral es realizada y analizada mediante citometría de flujo. Las células son permeabilizadas y fijadas utilizando el kit Cytotfix/Cytoperm (Becton Dickinson) según los protocolos del fabricante y teñidas con un Mab anti-p24 fluorescente (clon KC57 - Coulter Beckman) utilizado en una dilución 1/160 incubada durante 10 minutos a 4°C a oscuras. Tras su lavado en un medio PBS-3% FCS, las PBMC se diluyen en PBS antes del análisis por citometría de flujo. Se determina el porcentaje de células positivas a p24 en las diferentes muestras activando 20.000 episodios en una población celular viva. los subconjuntos celulares vivos se analizan respecto a la expresión de p24 en relación a la tinción de fondo de las células no infectadas. El valor positivo al antígeno p24 se obtiene tras la extracción de los episodios de fondo en las células infectadas de manera simulada. El porcentaje de neutralización se define como la reducción de las células positivas a p-24 en comparación con los pocillos infectados control sin Mab. El valor de neutralización se define como la dilución de Mab que permite una disminución de 90% en el porcentaje de células infectadas. Los Mab anti-CXCR4 515H7 y 301aE5 se comparan con el Mab 12G5 conocido como el Mab anti-CXCR4 de referencia para la aplicación de VIH. Como se muestra en las figuras 4A y B y 5, los Mab anti-CXCR4 515H7 y 301aE5 pueden inhibir la replicación de aislado primario KON de VIH-1 en PBMC con IC₉₀ de 10 µg/ml (66 nM) y 150 µg/ml (1 µM), respectivamente, mientras que el Mab 12G5 no consigue inhibir la replicación del aislado primario KON de VIH-1 en PBMC (figura 4A).

Ejemplo 6: Movilización con el receptor CXCR4 como mediador de las reservas de calcio intracelular

Este análisis funcional fue diseñado para controlar la señalización del receptor CXCR4, mediante la estimulación de la ruta de la fosfolipasa C, provocando la liberación de calcio desde las reservas intracelulares del retículo endoplásmico.

Las células CHO-K1 que expresan de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 humano se obtuvieron por transfección de las células CHO-K1 naturales (ATTC CCL-61) con un vector de expresión de mamífero portador de

la secuencia de codificación completa del receptor CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). Las células se propagan en un medio de cultivo completo [DMEM-Ham's F12 suplementado con 5% de suero de ternero fetal (FCS) y 500 µg/ml de geneticina]. Las células se sembraron en placas 96MW negras a una densidad de 100.000 células/pocillo en medio de cultivo apropiado. Las células murieron de inanición durante la noche antes de realizar los experimentos. Las células se cargaron con el colorante fluorescente de calcio (Fluo-4 No Wash, Invitrogen EE.UU.) en tampón de carga [HBSS 1x, HEPES 20 mM, Probenecid ácido 25 mM] durante 30 min. a 37°C seguido de 30 min. a 25°C. La estimulación por SDF-1 se realizó mediante inyección directa en cada pocillo. Para los experimentos de antagonismo, se añadieron directamente 10 µl de solución de Mab en el tampón de carga por lo menos 10 min. antes de SDF-1. Se realizaron mediciones de la cinética de la fluorescencia en un lector multimodo de microplacas de fluorescencia Mithras LB940 (Berthold) utilizando la siguiente configuración: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10.000 unidades arbitrarias. Se registró la fluorescencia en cada pocillo durante 0,1 segundos cada segundo y durante un período de 20 seg antes de la inyección de SDF-1 (señal basal). A continuación se inyectaron 20 µl de SDF-1 y se registraron los datos seguido de un período de 2 min. Cada condición experimental se realizó por duplicado. Los valores para cada pocillo se corrigieron en primer lugar restando la fluorescencia basal y la fluorescencia emitida por un pocillo de referencia sin células. Los datos relativos se expresaron como un porcentaje de la estimulación máxima obtenida por SDF-1 (100 nM).

SDF1 (100 nM) provocó una liberación rápida y fuerte de calcio intracelular en CHO/CXCR4 recombinante, mientras que no se detectó ninguna señal de fluorescencia en células CHO-K1 indiferenciadas. La intensidad máxima alcanzó > 140% más de fluorescencia basal y se observó a aproximadamente 40 seg. tras la estimulación por SDF-1 (figuras 6A, 6B y 6C). Los Mab 515H7 (133 nM) (figura 6A) y c515H7 (133 nM) (figura 6C) proporcionan una inhibición fuerte de la señal de calcio provocada por SDF-1 (100 nM). El Mab 301aE5 (133 nM) (figura 6B) proporciona una inhibición parcial de la señal de calcio inducida por SDF-1 (100 nM). en las tres estirpes celulares investigadas.

Ejemplo 7: Inhibición de la replicación de los aislados primarios de VIH-1 KON, MN y 92UG024 (virus X4) en PBMC humanas mediante los Mab anti-CXCR4 515H7, c515H7 y 301aE5

Ensayo de neutralización de ciclo único.

Este ensayo se realiza en 36 h utilizando unos aislados primarios KON, MN y 92UG024 concentrados y diluidos en consecuencia para permitir la detección de linfocitos T CD4 infectados al 2% tras 2 días de infección.

Son incubados veinticinco microlitros de varias diluciones de Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 durante 1 h a 37°C con 25 µl de virus. Se añaden PBMC humanas (25 µl) en 20 x 10⁶ células/ml a la mezcla de Mab/virus en una placa de 96 pocillos (U-bottom, Costar 3599) y se cultivan durante 36 h en RPMI 1640 con FCS al 10% y 20 U/ml de IL-2 (R & D Systems, Minneapolis, MN).

Tras 2 días de cultivo, son detectados linfocitos infectados por VIH mediante tinción intracelular del ag p24 viral. Las células son fijadas y permeabilizadas utilizando kits Cytofix/Cytoperm y Perm/Wash (BD Biosciences) según el fabricante y teñidas con un Mab anti-p24 fluorescente (FITC- o PE-anti-p24, clon KC57; Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL) utilizado en una dilución 1/160 en una disolución Perm/Wash añadida durante 15 minutos a 4°C. Tras lavar en PBS con FBS al 3%, son diluidas las PBMC en 300 µl de PBS antes del análisis por citometría de flujo (LSRII; BD Biosciences) con un software DIVA (BD Biosciences). El porcentaje de células positivas a p24 se determina en las diferentes muestras activando 20.000 episodios en una población celular viva identificada mediante parámetros de dispersión lateral y delantera. Los subconjuntos de células vivas son analizados con la kit de disolución live/dead (Invitrogen). El valor positivo al Ag p24 se obtiene tras la eliminación de los episodios de fondo en las células infectadas de manera simulada.

El porcentaje de neutralización se define como la reducción de las células positivas a p24 en comparación con los pocillos infectados control sin Mab. El valor de neutralización se define con la concentración de anticuerpo (interpolada entre las diluciones sucesivas realizadas por triplicado) que permite un descenso de 90% en el porcentaje de células infectadas.

Como se representa en las figuras 7, 8 y 9, los Mab anti-CXCR4 515H7, c515H7 y 301aE5 pueden inhibir la replicación de los aislados primarios MN, KON y 92UG024 de VIH-1 X4 en las PBMC. Los resultados de IC (en µg/ml) se presentan en la tabla 9.

Tabla 9

	KON			MN			92UG024		
	% de inhibición de células infectadas			% de inhibición de células infectadas			% de inhibición de células infectadas		
	90	80	50	90	80	50	90	80	50
301aE5	>150	>150	150	>150	150	1	>150	150	50
515H7	15	8	1	10	1,5	<1,5	10	3	0,5
c515H7	20	1	1,5	15	1	<1,5	15	3	<1,5

Ejemplo 8: Inhibición de la replicación del aislado primario de VIH-1 89.6 (virus X4/R5 dual) en PBMC humanas mediante Mab anti-CXCR4 515H7, c515H7 y 301aE5Ensayo de neutralización de ciclo único.

5 Este ensayo se realiza en 36 h utilizando un aislado primario 89.6 concentrado y diluido en consecuencia para permitir la detección de linfocitos T CD4 infectados al 2% tras 2 días de infección.

10 Son incubados veinticinco microlitros de varias diluciones de Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 durante 1 h a 37°C con 25 µl de virus. Se añaden PBMC humanas (25 µl) en 20×10^6 células/ml a la mezcla de Mab/virus en una placa de 96 pocillos (U-bottom, Costar 3599) y se cultivan durante 36 h en RPMI 1640 con FCS al 10% y 20 U/ml de IL-2 (R & D Systems, Minneapolis, MN).

15 Tras 2 días de cultivo, son detectados linfocitos infectados por VIH mediante tinción intracelular del ag p24 viral. Las células son fijadas y permeabilizadas utilizando kits Cytotfix/Cytoperm y Perm/Wash (BD Biosciences) según el fabricante y teñidas con un Mab anti-p24 fluorescente (FITC- o PE-anti-p24, clon KC57; Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL) utilizado en una dilución 1/160 en una disolución Perm/Wash añadida durante 15 minutos a 4°C. Tras lavar en PBS con FBS al 3%, son diluidas las PBMC en 300 µl de PBS antes del análisis por citometría de flujo (LSRII; BD Biosciences) con un software DIVA (BD Biosciences). El porcentaje de células positivas a p24 se determina en las diferentes muestras activando 20.000 episodios en una población celular viva identificada mediante parámetros de dispersión lateral y delantera. Los subconjuntos de células vivas son analizados con la kit de disolución live/dead (Invitrogen). El valor positivo al Ag p24 se obtiene tras la eliminación de los episodios de fondo en las células infectadas de manera simulada.

25 El porcentaje de neutralización se define como la reducción de las células positivas a p24 en comparación con los pocillos infectados control sin Mab. El valor de neutralización se define con la concentración de anticuerpo (interpolada entre las diluciones sucesivas realizadas por triplicado) que permite un descenso de 90% en el porcentaje de células infectadas.

30 Como se representa en las figuras 10 y 11, los Mab anti-CXCR4 515H7, c515H7 y 301aE5 pueden inhibir la replicación del aislado primario 89.6 de VIH-1 en las PBMC. Los resultados de IC (en µg/ml) se presentan en la tabla 10.

Tabla 10

35

	KON		
	% de inhibición de células infectadas		
	90	80	50
301aE5	>150	150	20
515H7	15	1,5	<1,5
c515H7	10	1,5	<1,5

Ejemplo 9: Inhibición de la replicación de los aislados primarios 89.6 y UG93067 (virus X4/R5 duales) en PBMC humanas mediante el Mab anti-CXCR4 c515H7 combinado con la molécula de Maraviroc anti-CCR5.

40 Ensayo de neutralización, analizando una tanda múltiple de replicación de aislado primario de VIH en las PBMC primarias:

45 Este ensayo que combina unas diluciones en serie de Mab c515H7 o Maraviroc o una combinación de ambos con unas diluciones en serie de virus, analiza unas tandas múltiples de infección en las PBMC (células mononucleares de sangre periférica). En resumen, son incubadas unas mismas cantidades de 25 µl de cuadruplicado de diluciones en serie (duplicadas) de Mab c515H7 o Maraviroc o una combinación de ambos con 25 µl de diluciones en serie del virus en placas de filtro de 96 pocillos prehidratadas (tamaño de poro de 1,25 µm, Durapor Dv; Millipore, Molsheim, Francia). Se realiza una valoración de control del virus (25 µl de RPMI que sustituye los Mab c515H7 o Maraviroc diluidos) en la misma placa que las valoraciones en presencia de diluciones de los Mab c515H7 o Maraviroc o la combinación de ambos. Tras 1 h a 37°C, son añadidos 25 µl de PBMC estimulada por PHA a una concentración de 4×10^6 células/ml (reservorio de PBMC activadas con PHA de cinco donantes sanos) para alcanzar un volumen de cultivo final de 75 µl de RPMI, suero de ternero fetal al 10%, y 20 IU de interleucina-2 (IL-2) por ml (R&D System). Tras 24 h a 37°C, se añaden 100 µl del mismo medio de cultivo. Se realizan dos lavados (200 µl de RPMI cada uno) por filtración el día 4 para extraer los Mab c515H7 y Maraviroc, y se añaden 200 µl de medio de cultivo fresco.

55 Durante el día 7, se mide la presencia de p24 en los sobrenadantes del cultivo mediante ELISA y se compara con la de los controles negativos (cultivos infectados con diluciones de virus y mantenidos en presencia de 10^{-6} M de zidovudina [AZT] para determinar los pocillos positivos. Los pocillos cuadruplicados son utilizados para determinar la valoración viral (dosis de infección de cultivo tisular del 50% [TCID₅₀] en ausencia (v₀) y en presencia (v_n) de cada dilución de los Mab c515H7 o Maraviroc o una combinación de ambos. El valor de neutralización se define como la

dilución de Mab c515H7 o Maraviroc o una combinación de ambos que resulta en una disminución de 90% de la valoración viral ($v_t/v_0 = 0,1$).

Como se representa en la figura 12, la replicación del virus 89.6 X4R5 trópico dual es inhibida por los Mab c515H7 con una IC_{90} de 2 $\mu\text{g/ml}$ (figura 12). Maraviroc a 50 $\mu\text{g/ml}$ no alcanza la actividad inhibitoria de IC_{90} (figura 12). Además, la adición de Maraviroc a 2 $\mu\text{g/ml}$ al anticuerpo 515H7 aumenta la actividad inhibitoria de los Mab c515H7 con una IC_{90} de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (figura 12).

El efecto beneficioso de la combinación de Mab c515H7 y Maraviroc es evaluado utilizando diversas diluciones de las dos moléculas y otro virus trópico dual UG93067. Como se representa en la figura 13, es similar la actividad inhibitoria de los Mab c515H7 y Maraviroc. Estos resultados sugieren que la capacidad del virus UG93067 para utilizar el receptor CCR5 o CXCR4 es comparable. Podría evidenciarse una mejor actividad utilizando el virus UG93067, únicamente la combinación de estos inhibidores (10 $\mu\text{g/ml}$ de cada) de X4 (Mab c515H7) y R5 (Maraviroc) permiten una reducción de 90% del valor del virus (figura 13).

Ejemplo 10: Producción de Mab c515H7 híbridos anti-CXCR4

Se diseñaron formatos híbridos de Mab 515H7 murino: corresponde a los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo murino de interés, fusionados genéticamente a dominios constantes humanos Ckappa e IgG1/IgG2/IgG4. Se produjo Mab recombinante después de la transfección temporal utilizando el sistema HEK293/EBNA con un vector de expresión pCEP4 (InVitrogen, EE.UU.).

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivas se describen anteriormente en la memoria. Además, como la tabla 3 anterior divulga las secuencias de IgG2 y 4 isotipos (que son los isotipos preferidos), puede ser asimismo mencionada la secuencia de la cadena pesada del isotipo IgG1, es decir, el c515H7 VH (G1wt) que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 80 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 81.

Las secuencias nucleotídicas completas correspondientes a los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas de Mab 515H7 se sintetizaron por síntesis génica global (Genecust, Luxemburgo). Éstas se subclonaron en un vector pCEP4 (InVitrogen, EE.UU.) que lleva la secuencia de codificación completa del dominio constante de la cadena ligera [Ckappa] o de la cadena pesada [CH1-bisagra-CH2-CH3] de una inmunoglobulina IgG1/IgG2/IgG4 humana. Todas las etapas de clonación se llevaron a cabo según técnicas de biología molecular convencionales como se describe en el manual de laboratorio (Sambrook y Russel, 2001) o según las instrucciones del proveedor. Cada montaje genético se validó totalmente por secuenciación de nucleótidos utilizando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EE.UU.) y se analizó utilizando un analizador genético 3100 (Applied Biosystems, EE.UU.).

Se cultivaron rutinariamente células HEK293 EBNA adaptadas a suspensión (InVitrogen, EE.UU.) en matraces de 250 ml en 50 ml de medio exento de suero Excell 293 (SAFC Biosciences) enriquecido con glutamina 6 mM en un agitador orbital (velocidad de rotación 110 rpm). La transfección temporal se realizó con $2 \cdot 10^6$ células/ml utilizando polietilenimina (PEI) lineal de 25 kDa (Polysciences) preparada en agua a una concentración final de 1 mg/ml mezclada y ADN plásmido (concentración final de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ para la relación de plásmido de cadena pesada a ligera de 1:1). 4 horas después de la transfección, el cultivo se diluyó con un volumen de medio de cultivo reciente para alcanzar una densidad celular final de 10^6 células/ml. El proceso de cultivo se controló sobre la base de la viabilidad celular y la producción de MAB. Por lo general, los cultivos se mantuvieron durante 4 a 5 días. Mab se purificó utilizando un método de cromatografía convencional sobre una resina de Proteína A (GE Healthcare, EE.UU.). Mab se produjo en concentraciones adecuadas con determinaciones funcionales. Las concentraciones productivas oscilan por lo general entre 6 y 15 mg/l de Mab purificado.

Ejemplo 11: Caracterización por análisis FACS de especificidad de fijación de Mab c515H7 híbrido anti-CXCR4

En este experimento, se examinó por análisis FACS la fijación específica a CXCR4 humana de Mab c515H7 híbrido anti-CXCR4.

Las células transfectadas NIH3T3-hCXCR4 se incubaron con un intervalo de dosificación de anticuerpo monoclonal c515H7 de 0 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$. Las células se lavaron después con 1% de BSA/PBS/0,01% de NaN_3 . A continuación, se añadieron a las células anticuerpos secundarios marcados con Alexa y se dejaron incubar a 4°C durante 20 min. A continuación las células se lavaron de nuevo dos veces. Tras el segundo lavado, se realizó un análisis FACS. Los resultados de este estudio de fijación se proporcionan en la figura 15 que demuestra que el Mab c515H7 híbrido anti-CXCR4 se une específicamente a la estirpe celular transfectada CXCR4-NIH3T3 humana. No se detecta ninguna unión a las células NIH3T3 wt (datos no representados).

Ejemplo 12: Efecto del Mab c515H7 sobre el homodímero de CXCR4, mediante un enfoque transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET)

Este análisis funcional permite determinar los cambios de configuración provocados en SDF-1 y/o Mab c515H7 que se fijan al receptor CXCR4 al nivel del homodímero CXCR4.

Se construyeron vectores de expresión para las parejas de interacción investigadas como proteínas de fusión con el colorante correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, Rluc y proteína fluorescente amarilla, YFP) aplicando técnicas de biología molecular convencionales. Dos días antes de realizar los experimentos BRET, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con vectores de expresión que codifican las correspondientes parejas BRET: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR. Al día siguiente, las células se distribuyeron en placas 96 MW blancas recubiertas previamente de polilisina en medio de cultivo completo [DMEM enriquecido con 10% de FBS]. Las células se cultivaron en primer lugar a 37°C con CO₂ al 5% a fin de permitir la fijación de células a la placa. Las células murieron entonces de inanición con 200 µl de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento BRET, se eliminó DMEM y las células se lavaron rápidamente con PBS. Las células se incubaron a continuación en PBS en presencia o ausencia de anticuerpo, 10 min a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 µM con o sin SDF-1 100 nM en un volumen final de 50 µl. Después de la incubación durante 10 minutos adicionales a 37°C, se inició la absorción de la emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el lector multitargeta de Mithras LB940 (Berthold) (1s/longitud de onda/pocillo repetida 15 veces a temperatura ambiente).

El cálculo de la relación de BRET se realizó como se ha descrito anteriormente (Angers *et al.*, 2000.): $[(Emisión_{530\text{ nm}}) - (emisión_{485\text{ nm}}) \times Cf] / (emisión_{485\text{ nm}})$, donde $Cf = (emisión_{530\text{ nm}}) / (emisión_{485\text{ nm}})$ para las células que expresan la proteína de fusión Rluc sola en las mismas condiciones experimentales. La simplificación de esta ecuación demuestra que la relación BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando las dos parejas BRET están presentes, corregida por la relación 530/485 nm obtenida en las mismas condiciones experimentales, sólo cuando la pareja fusionada a Rluc está presente en la ensayo. Para facilitar la lectura, los resultados se expresan en unidades miliBRET (MBU); MBU corresponde a la relación BRET multiplicada por 1000.

SDF1 (100 nM) aumentó en aproximadamente un 10% la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donantes y aceptadoras fusionadas al receptor CXCR4, es probable que indique la formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o cambios de configuración de dímeros de preexistentes (figura 16). El Mab c515H7 pudo modular los cambios de configuración inducidos por SDF-1 para los homodímeros de CXCR4 (96% de inhibición de aumento de BRET inducido por SDF-1, figura 16). El Mab c515H7 pudo asimismo modular por sí mismo la proximidad espacial de CXCR4/CXCR4 lo que indica una influencia de este Mab en la configuración del homodímero CXCR4/CXCR4 (figura 16).

Ejemplo 13: Evaluación *in vitro* de la actividad anti-VIH-1 del Mab 515H7 utilizando células de osteosarcoma humanas (GHOST) transducidas con GFP que expresan CD4 y CXCR4 o CCR5.

Con el fin de determinar la especificidad del Mab 515H7 de CXCR4, se evalúa la actividad anti-VIH-1 de este Mab utilizando las células GHOST que expresan CD4 y CXCR4 o CCR5.

Este ensayo es realizado en 48 h utilizando el virus LAI de VIH-1 X4 (con las células Ghost que expresan CXCR4) o el virus BaL de VIH-1 R5 (con las células Ghost que expresan CCR5). Son sembrados 500 µl de células Ghost (2.5 10⁵ células/ml) durante 24 h en un medio de cultivo Dulbecco suplementado con FCS al 10%. Son incubadas varias diluciones de Mab 515H7 durante 1 h a 37°C y a continuación se añaden virus LAI de VIH-1 (1/10) y virus BaL de VIH-1 (1/7) diluidos a las células durante 48 h. Las células son sometidas a tripsina y lavadas con PBS 1X. Se añaden a los sedimentos celulares 300 µL de paraformaldehído al 1,5% durante 2 h a +4°C a oscuras, con el fin de fijar las células e inactivar los virus. Las células GFP-positivas son analizadas mediante citometría de flujo y se calcula la inhibición de la infección por VIH-1.

El porcentaje de inhibición de las células infectadas se define como el comparado con los pocillos infectados de control sin Mab. Los resultados de las IC (en µg/ml) son presentados en la tabla 11, el Mab 515H7 anti-CXCR4 puede inhibir la infección por el virus Lai de VIH-1 X4 en las células Ghost que expresan CXCR4 pero es totalmente inactivo en la inhibición de la infección por el virus BaL de VIH-1 R5 en las células Ghost que expresan CCR5.

Tabla 11

	Ghost CXCR4/virus LAI			Ghost CCR5/virus BaL		
	% de inhibición de células infectadas			% de inhibición de células infectadas		
	90	80	50	90	80	50
515H7	0,5	0,1	0,08	>75	>75	>75

Ejemplo 14: Humanización de anticuerpo 515H7 anti-CXCR4 murino y generación de un fragmento de dicho h515H7.Procedimiento general

5 La humanización del anticuerpo 515H7 anti-CXCR4 se realizó aplicando las reglas generales de injerto de CDR. El análisis inmunogenético y la definición de CDR y las regiones marco (FR) se llevaron a cabo aplicando el esquema de numeración única de IMGT, así como las bibliotecas y herramientas de IMGT (Lefranc, 1997 - www.imgt.org).

10 La fijación de las variantes humanizadas de 515H7 se determinó también en una estirpe celular NIH3T3 transfectada de forma estable con CXCR4 humano. La actividad de fijación se determinó mediante un ensayo competitivo con el anticuerpo de ratón biotinilado. En un segundo intento, se determinó la capacidad de los anticuerpos humanizados para inhibir la fijación de SDF-1 biotinilado a células de Ramos. Se eligieron las células de Ramos debido a su alta expresión de CXCR4 y baja expresión de CXCR7 y SDF-1.

15 Estos análisis se utilizaron para caracterizar las versiones humanizadas recombinantes de anticuerpos anti-CXCR4. Los dominios variables se formatearon con dominios constantes IgG₁/k humanos y se clonaron en el vector de expresión pCEP de mamíferos. Anticuerpos recombinantes derivados de IgG₁/k se expresaron temporalmente en células HEK293. Los sobrenadantes de cultivo de expresión se filtraron y los anticuerpos se purificaron utilizando proteína A sefarosa. Los anticuerpos purificados se volvieron a tamponar en PBS y las concentraciones de anticuerpos se determinaron por ELISA.

20 Los fragmentos de anticuerpo recombinantes son generados mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los dominios variables del anticuerpo humanizado y subclonándolos en un sistema de *E. coli*. La purificación de los fragmentos de anticuerpo se realiza mediante cromatografía de afinidad de ión metálico inmovilizado.

- Humanización de los dominios variables de 515H7

30 Las alineaciones de las secuencias diferentes de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras son ilustradas en las figuras 17 y 18.

35 En una primera serie de experimentos, son analizadas las actividades de unión anti-CXCR4 de las tres primeras variantes humanizadas. Se combina la variante de VH 1 (VH1) con la VL murina y estos constructos son evaluados respecto a su capacidad para inhibir la unión de un anticuerpo parental 515H7 murino biotinilado. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de VH1 comprende la SEC ID nº 90 mientras que la secuencia de nucleótidos comprende la SEC ID nº 91. La secuencia de aminoácidos del VH1 de longitud completa comprende la SEC ID nº 92 mientras que la secuencia de nucleótidos comprende la SEC ID nº 93. Este constructo presenta una capacidad similar para competir con el anticuerpo murino a la del anticuerpo híbrido (figura 19A). Esto indica que la variante de VH más humana presenta la misma capacidad de unión que la híbrida. Por lo tanto, el VH1 se combina con la variante 2 de VL (figura 19B).

40 En otros experimentos, se determina si las variantes humanizadas del anticuerpo 515H7 inhiben la unión de SDF-1 a las células que expresan el CXCR4 (figura 20). La capacidad de inhibición de las variantes humanizadas de hz515H7 se evalúa detectando SDF-1 biotinilado en citometría de flujo. El anticuerpo humanizado hz515H7 VH1 VL2 presenta una capacidad similar para inhibir la unión de SDF-1 que el c515H7 híbrido.

45 Se somete a ensayo asimismo un fragmento de anticuerpo de la variante humanizada hz515H7 VH1 VL2 y se determina que dicho fragmento de anticuerpo puede inhibir completamente la unión de SDF-1 (figura 20).

50 Ejemplo 15: Caracterización por análisis FACS de la especificidad de fijación de los Mab 515H7 humanizados anti-CXCR4

55 En este experimento, se examinó por análisis FACS la fijación específica a CXCR4 humana de los Mab 515H7 humanizados anti-CXCR4.

60 Células NIH3T3, NIH3T3 transfectadas con hCXCR4 se incubaron con 0 a 10 µg/ml de Mab 515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2, hz515H7 VH1 D76N VL2.3) durante 20 min a 4°C en la oscuridad en 100 µl de tampón Facs. Después de 3 lavados en tampón Facs, las células se incubaron con el anticuerpo secundario, un Alexa 488 antihumano en cabra (dilución 1/500), durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Después de 3 lavados en tampón Facs, se añadió yoduro de propidio en cada pocillo y sólo las células viables se analizaron por FACS. Se cuantificaron por lo menos 5.000 células viables para determinar el valor medio de intensidad de fluorescencia para cada condición.

65 Los resultados de estos estudios de fijación se proporcionan en la figura 21 que demuestra [intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida por FACS] que los Mab hz515H7 humanizados anti-CXCR4 se unen específicamente a la estirpe celular humana NIH3T3 transfectada con CXCR4 (IFM = 2.2 con células madre NIH3T3)

Ejemplo 16: Efecto de los Mab hz515H7 sobre el homodímero de CXCR4, mediante un enfoque de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET)

5 Este análisis funcional permite determinar los cambios de configuración provocados en SDF-1 y/o los Mab hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2, hz515H7 VH1 VL2.3 que se fijan al receptor CXCR4 al nivel del homodímero de CXCR4.

10 Los vectores de expresión para las parejas de interacción investigadas se construyeron como proteínas de fusión con el colorante correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, Rluc y proteína fluorescente amarilla, YFP) mediante la aplicación de técnicas convencionales de biología molecular. Dos días antes de realizar los experimentos BRET, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con vectores de expresión que codifican las correspondientes parejas de BRET: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4. Al día siguiente, las células se distribuyeron en placas 96 MW blancas recubiertas previamente de polilisina en medio de cultivo completo [DMEM enriquecido con FBS al 10%]. Las células se cultivaron en primer lugar a 37°C con CO₂ al 5% con el fin de permitir la fijación de las células a la placa. Las células murieron entonces de inanición con 200 µl de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento BRET, se eliminó DMEM y las células se lavaron rápidamente con PBS. Se incubaron las células a continuación en PBS en presencia o ausencia de anticuerpos, 10 min a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 µM con o sin SDF-1 100 nM en un volumen final de 50 µl. Después de la incubación durante 10 minutos adicionales a 37°C se inició la absorción de emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el lector multitargeta Mitra LB 940 (Berthold) (1s/longitud de onda/pocillo repetido 15 veces a temperatura ambiente).

25 El cálculo de la relación de BRET se realizó como se ha descrito anteriormente (Angers *et al.*, 2000.): $[(emisión_{530\text{ nm}} - (emisión_{485\text{ nm}}) \times Cf) / (emisión_{485\text{ nm}})]$, donde $Cf = (emisión_{530\text{ nm}}) / (emisión_{485\text{ nm}})$ para las células que expresan la proteína de fusión Rluc solo en las mismas condiciones experimentales. Simplificando esta ecuación se demuestra que la relación BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando las dos parejas BRET están presentes, corregida por la relación 530/485 nm obtenida en las mismas condiciones experimentales, sólo cuando la pareja fusionada a Rluc está presente en el ensayo. Para facilitar la lectura, los resultados se expresan en unidades milIBRET (MBU); MBU corresponde a la relación BRET multiplicado por 1000.

35 SDF1 (100 nM) aumentó en un 12% la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donantes y aceptadoras fusionadas al receptor CXCR4, es probable que indique la formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o cambios de configuración de dímeros de preexistentes (figura 22).

40 Los Mab 515H7 humanizados pueden modular los cambios de configuración provocados por SDF-1 para homodímeros de CXCR4 con un porcentaje de inhibición del aumento de BRET provocado por SDF-1 de aproximadamente 88% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2, 65% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.1, 33% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.2 y 21% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.3 (figura 22).

Listado de secuencias

45 <110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
KLINGUER-HAMOUR, Christine

<120> Nuevos anticuerpos para el tratamiento del VIH

<130> 356254 D27470

50 <150> EP09159076.0
<151> 2009-04-29

<150> US61/173680
<151> 2009-04-29

55 <160> 93

<170> PatentIn version 3.5

60 <210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

ES 2 534 313 T3

<400> 7

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 8

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 534 313 T3

<400> 9
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

5 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 10
Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser
 1 5

15 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 11
Asp Asn Tyr Met Ser
 1 5

25 <210> 12
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 12
Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Arg Gly

35 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <400> 13
Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

45 <210> 14
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

50 <400> 14
 cagagtctgt tcaacagtcg aaccgaaag aactac 36

55 <210> 15
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

60 <400> 15
 tgggcatcc 9

65 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

ES 2 534 313 T3

	<400> 16		
	atgcaatctt ttaatcttcg gacg	24	
5	<210> 17 <211> 24 <212> ADN <213> Mus musculus		
10	<400> 17		
	gggttcacct tcaactgataa ctac	24	
15	<210> 18 <211> 30 <212> ADN <213> Mus musculus		
20	<400> 18		
	attagaaca aagctaagtg ttacacaaca	30	
25	<210> 19 <211> 33 <212> ADN <213> Mus musculus		
30	<400> 19		
	gcaagagatg tcggttccaa ctacttgac tac	33	
35	<210> 20 <211> 336 <212> ADN <213> Mus musculus		
	<400> 20		
	gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact	60	
	atgagctgca aatccagtca gagtctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttggct	120	
	tgggtaccagc agaagccagg gcagtcctct aaactgctga tctactgggc atccgctagg	180	
	gattctgggg tcctgctcg cttcacaggc agtggatctg agacatattt cactctcacc	240	
	atcagccgtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc ttttaatctt	300	
	cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa	336	
40	<210> 21 <211> 360 <212> ADN <213> Mus musculus		
45	<400> 21		
	gagggtgaacc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtacagc ctgggggttc tctgagactc	60	
	tcctgtgcaa cttctggggt caecttcact gataactaca tgagttgggt ccgccagcct	120	
	ccaggaaagg cacttgagtg gttgggcttt attagaaca aagctaagtg ttacacaaca	180	
	gactacagtg catctgtgag gggctgggtc accatctcaa gagataattc ccaaagcatc	240	
	ctctatcttc aaatgaacgc cctgagagcc gaagacagtg ccacttatta ctgtgcaaga	300	
	gatgtcgggt ccaactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca	360	
50	<210> 22 <211> 51 <212> ADN <213> Mus musculus		

ES 2 534 313 T3

<400> 22
 aaatccagtc agagtctgtt caacagtcga acccgaaaga actactggc t 51

5 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10 <400> 23
 tgggcatccg ctagggattc t 21

<210> 24
 <211> 15
 15 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 24
 gataactaca tgagt 15

20 <210> 25
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25 <400> 25
 ttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagactaca gtgcatctgt gaggggt 57

<210> 26
 30 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 26
 35 gatgtcgggt ccaactactt tgactac 27

<210> 27
 <211> 352
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
 20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
 35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
 50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
 65 70 75 80

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
 85 90 95

ES 2 534 313 T3

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val
 100 105 110
 His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala
 115 120 125
 Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser
 130 135 140
 Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
 145 150 155 160
 Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
 165 170 175
 Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn
 180 185 190
 Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu
 195 200 205
 Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser
 210 215 220
 Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr
 225 230 235 240
 Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr
 245 250 255
 Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln
 260 265 270
 Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
 275 280 285
 Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe
 290 295 300
 Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val
 305 310 315 320
 Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly
 325 330 335
 His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
 340 345 350

<210> 28
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

ES 2 534 313 T3

<400> 28

Met Ser Ile Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr
 1 5 10 15

Thr Glu Glu Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys
 20 25 30

Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile
 50 55 60

Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr
 65 70 75 80

Arg Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro
 85 90 95

Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu
 100 105 110

Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val
 115 120 125

Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His
 130 135 140

Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val
 145 150 155 160

Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe
 165 170 175

Ile Phe Ala Asn Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg
 180 185 190

Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile
 195 200 205

Met Val Gly Leu Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys
 210 215 220

Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys
 225 230 235 240

ES 2 534 313 T3

Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp
 245 250 255

Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu
 260 265 270

Ile Ile Lys Gln Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile
 275 280 285

Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile
 290 295 300

Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala
 305 310 315 320

Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly
 325 330 335

Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser
 340 345 350

Phe His Ser Ser
 355

<210> 29
 <211> 360
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys
 1 5 10 15

Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe
 20 25 30

Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
 35 40 45

Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu
 50 55 60

Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg
 65 70 75 80

Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu
 85 90 95

Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp

10

ES 2 534 313 T3

100	105	110
Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val 115 120 125		
Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg 130 135 140		
Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr 145 150 155 160		
Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu 165 170 175		
Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val 180 185 190		
Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg 195 200 205		
Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu 210 215 220		
Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys 225 230 235 240		
Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val 245 250 255		
Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu 260 265 270		
Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg 275 280 285		
Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile 290 295 300		
Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys 305 310 315 320		
Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser 325 330 335		
Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser 340 345 350		
Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu 355 360		

<210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 30
 Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr
 1 5

<210> 31

ES 2 534 313 T3

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 31
Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly
 1 5

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 32
Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr
 1 5

15 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 33
Ala Arg Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

25 <210> 34
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 34
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

30 **Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln**
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

35 <210> 35
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 35

ES 2 534 313 T3

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Thr Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 7
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36
Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37
Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38
Asp Tyr Gly Val Tyr
1 5

<210> 39
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 39
Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 40
<211> 8

ES 2 534 313 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 40
Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr

5 1 5

<210> 41
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10 <400> 41
 cagagtctgt tcaacagtag aaccgaaag aactac 36

15 <210> 42
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

20 <400> 42
 aagcaatctt ataatcttcg gacg 24

25 <210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

30 <400> 43
 gggttctcat taaccgacta tggg 24

35 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

40 <400> 44
 atatggggtg atggaaccac a 21

45 <210> 45
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

50 <400> 45
 gccaggggta gacagttcgg gtttgactac 30

<210> 46
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 46
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctact 60
 atgaggtgca aatccagtca gagtctgttc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 120
 tggtagcaaac agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tcttctgggc atccattagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt 300
 cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

55 <210> 47
 <211> 348

ES 2 534 313 T3

<212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 47
 cagggtgcagc tgaaggagtc tgggcctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
 acatgcaccg tctcagggtt ctcatcacc gactatgggt tatactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg atggaaccac agactataat 180
 tcagctctca aatccagact gagcatcagt aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
 aaaatgaaca ctctgcaaac tgatgacaca gccaggtatt actgtgccag gggtagacag 300
 5 ttcgggtttg actactgggg ccaaggcacc acgctcacag tctcctca 348

<210> 48
 <211> 51
 <212> ADN
 10 <213> Mus musculus

<400> 48
 aaatccagtc agagtctgtt caacagtaga acccgaaaga actactggc t 51

15 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

20 <400> 49
 tgggcatcca ttaggaatc t 21

<210> 50
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 50
 aagcaatctt ataactctcg gacg 24

30 <210> 51
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

35 <400> 51
 gactatgggtg tatac 15

<210> 52
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

40 <400> 52
 atgatatggg gfgatggaac cacagactat aattcagctc tcaaatcc 48

<210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> Mus musculus

<400> 53
 ggtagacagt tcgggtttga ctac 24

55 <210> 54
 <211> 359
 <212> PRT

ES 2 534 313 T3

<213> Mus musculus

<400> 54

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

5

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gln Leu Lys Ser Ser Gly Ser Gly
115 120 125

Ser Glu Ser Lys Ser Thr Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
130 135 140

Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser
145 150 155 160

Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
180 185 190

Ala Arg Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu
195 200 205

Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
245 250 255

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
260 265 270

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
275 280 285

ES 2 534 313 T3

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 290 295 300

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 305 310 315 320

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 325 330 335

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 340 345 350

Glu His His His His His His
 355

<210> 55
 <211> 1077
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 55
 gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctgggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctt accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
 caattgaaa gcagcggcag cggtagcga agcaagtcga ccgacatcgt gatgaccag 420
 agcccagca gcctggccgt gtctctgggc gagcgggcca ccatgagctg caagagcagc 480
 cagagcctgt tcaacagccg gaccgggaag aactacctgg cctggtatca gcagaagccc 540
 ggccagtccc ccaagctgct gatctactgg gccagcgcga gagatagcgg cgtgcccgct 600
 cgctttaccg gcagcggcag cgagacctac ttcaccctga ccatcagccg ggtgcaggcc 660
 gaggacctcg ccgtgtacta ctgcatgcag agcttcaacc tgcggacctt cggccagggc 720
 accaaggtgg agatcaagac gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccca 780
 agcagcagag agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 840
 cccagggagg ccaaggtgca gtggaagtg gacaacgcc tgcagagcgg caacagccag 900
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 960
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 1020
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagc accatcatca ccacat 1077

10

<210> 56
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 56

ES 2 534 313 T3

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

ES 2 534 313 T3

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

<210> 57
 <211> 446
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 57
 Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn

10

ES 2 534 313 T3

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

<210> 58
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 58
 Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala
 50 55 60

10

ES 2 534 313 T3

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
210 215 220

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

ES 2 534 313 T3

325 330 335

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 59
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 59

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

10

ES 2 534 313 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 60
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 60
 gaagtgaacc tggaggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctgcggggc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccgg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacactgac cgtgtccagc 360
 gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggcctgtaca gctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660
 aagtacggcc caccctgccc cagctgccc gcccccgagt tcctgggagg acccagcgtg 720
 ttctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
 tgtgtgtgg tgagcgtgtc ccaggaggac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtttaa cagcacctac 900

10

ES 2 534 313 T3

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgtaaggtct ccaacaaggg cctgccaaagc agcatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
 ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccaccca gccaaagagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttcctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
 aacgtcttta gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt ccctgggctg a 1341

<210> 61
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 61
 gaagtgaacc tggaggagtc tggcggcggc ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagatc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctgcccggc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccgg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacactgac cgtgtccagc 360
 gccagacca agggcccaag cgtgttcccc ctggcccctt gctccagaag caccagcgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgcccgtgct gcagagcagc 540
 ggccctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccâagg tggacaagag ggtggagagc 660
 aagtacggcc caccctgccc ccctgcccâa gcccccgagt tcctggggcg acccagcgtg 720
 ttctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
 tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
 ggccgtggagg tgcaaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtttaâ cagcacctac 900
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgtaaggtct ccaacaaggg cctgccaaagc agcatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
 ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccaccca gccaaagagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttcctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
 aacgtcttta gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt ccctgggctg a 1341

10

<210> 62
 <211> 1338

ES 2 534 313 T3

<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 62

gaagtgaacc	tggtggagtc	tggcggcggg	ctggtgcagc	ctgggggag	cctgagactg	60
agctgcgcca	cctccggctt	caccttcacc	gacaactaca	tgagctgggt	gcgccagccc	120
cctggcaagg	ccctggaatg	gctgggcttc	atccggaaca	aggccaacgg	ctacaccacc	180
gactacagcg	ccagcgtgcg	gggcagattc	accatcagcc	gggacaacag	ccagagcatc	240
ctgtacctgc	agatgaacgc	cctgcggggc	gaggacagcg	ccacctacta	ctgtgcccgg	300
gacgtgggca	gcaactactt	cgactactgg	ggccagggca	ccacactgac	cgtgtccagc	360
gccagcacca	agggcccaag	cgtgttcccc	ctggccccct	gctccagaag	caccagcgag	420
agcacagccg	ccctgggctg	cctgggtgaag	gactacttcc	ccgagcccgt	gaccgtgtcc	480
tggaacagcg	gagccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	ccgccgtgct	gcagagcagc	540
ggcctgtaca	gcctgagcag	cgtggtgacc	gtgccaaagca	gcaacttcgg	caccagacc	600
tacacctgta	acgtggacca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagac	cgtggagagg	660
aagtgcctgtg	tggagtgcgc	ccctgcccc	gccccccag	tggccggacc	cagcgtgttc	720
ctgttcccc	ccaagcccaa	ggacaccctg	atgatcagca	gaacccccga	ggtgacctgt	780
gtggtggtgg	acgtgtccca	cgaggacccc	gaggtgcagt	tcaactggta	cgtggacggc	840
gtggaggtgc	acaacgccaa	gaccaagccc	agagaggagc	agtttaacag	caccttccgg	900
gtggtgtccg	tgctgacctg	ggtgcaccag	gactggctga	acggcaagga	gtacaagtgt	960
aaggtctcca	acaagggcct	gccagccc	atcgaaaaga	ccatcagcaa	gaccaagggg	1020
cagccaagag	agccacaggt	ctacaccctg	ccccccagca	gggaggagat	gaccaagaac	1080
caggtgtccc	tgacctgtct	ggtgaagggc	ttctacccaa	gcgacatcgc	cgtggagtgg	1140
gagagcaacg	gccagcccga	gaacaactac	aagaccaccc	ccccaatgct	ggacagcgac	1200
ggcagcttct	tcctgtacag	caagctgaca	gtggacaaga	gcagatggca	gcagggcaac	1260
gtgttcagct	gctccgtgat	gcacgaggcc	ctgcacaacc	actacacca	gaagagcctg	1320
5	agcctgtccc	caggctga				1338

<210> 63
<211> 660
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 63

gacatcgtga	tgagccagag	ccccagcagc	ctggccgtgt	ctgccggcga	gaaagtgacc	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

10

ES 2 534 313 T3

atgagctgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatatcagc agaagcccgg ccagtccccc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180
 gacagcggcg tgcccgccag attcaccggc agcggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atcagccggg tgcagggcca ggatctggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
 cggacctttg gcggcggaac aaagctggaa atcaagcgta cggtaggccc tcccagcgtg 360
 ttcattctcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtgta 660

<210> 64
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 64
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 65
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

ES 2 534 313 T3

<400> 65

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

5

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

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

10

<210> 67

<211> 446

<212> PRT

15

<213> Mus musculus

ES 2 534 313 T3

<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val

ES 2 534 313 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

ES 2 534 313 T3

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 69

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

10

ES 2 534 313 T3

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
210 215 220

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

ES 2 534 313 T3

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 70

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

10

ES 2 534 313 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 72
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 72
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaāāāācā gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

10

<210> 73
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 73
 gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggcga gggggccacc 60
 atgagctgca agagcagcca ggcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagtcccc aagctgctga tctactgggc cagcgcaga 180
 gatagcggcg tgcccgtcg ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240
 atcagccggg tgacggccga ggacctcggc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

20

<210> 74
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

ES 2 534 313 T3

<400> 74
gacatcgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccgacag attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctcccggg tgcaaggcca ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
cggaccttog gccagggcac caaggtgga atcaag 336

5 <210> 75
<211> 1341
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 75
gagggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctgaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca agccaacgg ctacaccaca 180
gagtacgccc ccagcgtgaa gggccggctc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcccagc 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcag 420
agcacagccc cctgggctg cctggtgaa gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgcccgtct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccaagacc 600
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660
aagtacggcc caccctgccc cagctgccc gccccagct tccctggggcg acccagcgtg 720
ttcctgttcc cccccagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcaacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtttaa cagcacctac 900
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
tgtaaggtct ccaacaaggg cctgccaaagc agcatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaaagagga gatgaccaag 1080
10 aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaa ggcttctacc caagcgacat cgcctggag 1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccagct gctggacagc 1200
gacggcagct tcttctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
aacgtcttta gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
ctgagcctgt ccctgggctg a 1341

15 <210> 76
<211> 1341
<212> ADN
<213> Mus musculus

ES 2 534 313 T3

<400> 76
gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
gccagacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct getccagaag caccagcgag 420
agcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 600
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660
aagtacggcc cacctgccc ccctgcccga gcccccgagt tcctggggcg acccagcgtg 720
ttcctgttcc cccccaaagg caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtttaa cagcacctac 900
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
tgtaaggtct ccaacaaggg cctgccaaagc agcatcgaag agaccatcag caaggccaag 1020
ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaaagagga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgcctggag 1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccgagt gctggacagc 1200
gacggcagct tcttcctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
aacgtcttta gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
ctgagcctgt ccctgggctg a 1341

- 5 <210> 77
- <211> 1338
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

ES 2 534 313 T3

<400> 77
gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctgggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggcctt cacottcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420
agcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccg gaccgtgtcc 480
tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccaaagca gcaacttcgg caccagacc 600
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac cgtggagagg 660
aagtgtctgtg tggagtgcc ccctgcccc gcccccagc tggccggacc cagcgtgttc 720
ctgttcccc ccaagccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
gtggtggtgg acgtgtcccc cgaggacccc gaggtgcagt tcaactggtg cgtggacggc 840
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtttaacag caccttccgg 900
gtggtgtccg tgctgaccgt ggtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
aaggtctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa gaccaaggga 1020
cagccaagag agccacaggt ctacaccctg cccccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaacg gccagccoga gaacaactac aagaccacc cccaatgct ggacagcgac 1200
ggcagcttct tcctgtacag caagctgaca gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
gtgttcagct gctccgtgat gcacgagggc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
agcctgtccc caggctga 1338

5 <210> 78
<211> 660
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 78
gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggca gcgggccacc 60
atgagctgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagtcccc aagctgctga tctactgggc cagcgcaga 180
gatagcggcg tgcccgtcg ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240
10 atcagccggg tgcaggccga ggacctcgcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300

ES 2 534 313 T3

cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgta cggaggccgc tcccagcgtg 360
 ttcattctcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca cggccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtgta 660

<210> 79
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 79
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
 atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccagacg attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctcccggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cggaggccgc tcccagcgtg 360
 ttcattctcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca cggccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtgta 660

10

<210> 80
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 80
 Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala
 50 55 60

ES 2 534 313 T3

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

ES 2 534 313 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

- <210> 81
- <211> 1353
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

5

<400> 81
 gaagtgaacc tggaggagtc tggcggcgga ctgggtgcagc ctgggggag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccttggaatg gctgggcttc atccggaaca agccaacag ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctgcggggc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccgg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccactactgac cgtgtccagc 360
 gccagcacca agggcccctc cgtgttcccg ctagccccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccttgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgcccgtgt gcagagcagc 540
 ggcctgtaca gcctgagcag cgtgggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagctgtg acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag cccccgagct gctgggcgga 720

10

ES 2 534 313 T3

cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag cagaaccccc 780
 gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc caccaggacc cagagtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gagtacaagt gtaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacaccc tgccaccag cagggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc aagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gagcagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc cccaggcaag tga 1353

<210> 82
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 82
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

10

<210> 83
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

ES 2 534 313 T3

<400> 83

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

5

<210> 84

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

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

10

ES 2 534 313 T3

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 85
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 85
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

10

ES 2 534 313 T3

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 86
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 86
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
 atgtcctgca agtccctcca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctcccggg tgcaggcca ggatgtggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

10

<210> 87
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 87
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
 atgtcctgca agtccctcca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctccagcc tgcaggcca ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

20

<210> 88
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

ES 2 534 313 T3

<400> 88
gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctcccggg tgcaaggcca ggatgtggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtgga atcaagcgta cggtagccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggaaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgccctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

5 <210> 89
<211> 657
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 89
gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctccagcc tgcaaggcca ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtgga atcaagcgta cggtagccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggaaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgccctgtgag 600
10 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

15 <210> 90
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 90
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

ES 2 534 313 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 91
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 91
 gaggtgcagc tggtaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcgggctt caccttcacc gacaactaca tgcctgggt ggcaccaggcc 120
 cctgaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca agccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

10

<210> 92
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 92
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 534 313 T3

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 93
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 93
 gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
 cctgaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
 gccagcacia agggcccaag cgtgttcccg ctagcccccga gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgcccgtgt gcagagcagc 540

5

10

ES 2 534 313 T3

ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccagacc	600
tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc	660
aagagctgtg acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag cccccgagct gctgggcgga	720
cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaaccccc	780
gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc cagaggacc cagaggtgaa gttcaactgg	840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac	900
agcacctaca ggggtggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag	960
gagtacaagt gtaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc	1020
aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag cagggaggag	1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg	1200
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gagcagatgg	1260
cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc	1320
cagaagagcc tgagcctgtc cccaggcaag	1350

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo anti-CXCR4 aislado, o uno de sus fragmentos funcionales, siendo dicho fragmento funcional seleccionado de entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y diacuerpos, caracterizado por que comprende:
- 10 - una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprenden respectivamente la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, 2 y 3; y una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden respectivamente la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, 5 y 6; o
- 10 - una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprenden respectivamente la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, 2 y 30; y una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden respectivamente la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 31, 32 y 33.
- 15 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, o un fragmento funcional del mismo, caracterizado por que dicho anticuerpo es:
- 20 - un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8 o
- 20 - un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 34, y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35.
- 25 3. Anticuerpo según la reivindicación 1, o un fragmento funcional del mismo, caracterizado por que es un anticuerpo híbrido y por que comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 56, 57 o 58, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 59.
- 30 4. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que es un anticuerpo humanizado y por que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia que consiste en SEC ID nº 64, y una región variable de la cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 65, 66, 82 u 83.
- 35 5. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que es un anticuerpo humanizado y por que comprende un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEC ID nº 67, 68 o 69, y una cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 70, 71, 84 u 85.
- 40 6. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho fragmento funcional consiste en un fragmento scFv, comprendiendo dicho scFv la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 54.
- 40 7. Ácido nucleico aislado, caracterizado por que es un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 45 8. Vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 7.
- 45 9. Célula hospedadora que comprende un vector según la reivindicación 8.
- 50 10. Procedimiento para la producción de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- 50 a) cultivar en un medio y en las condiciones de cultivo adecuadas una célula según la reivindicación 9; y
- b) recuperar dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos de este modo a partir del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.
- 55 11. Anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 6 para su utilización como un medicamento.
- 60 12. Anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que inhibe la replicación del aislado primario KON de VIH-1 en las PBMC con una IC₉₀ de por lo menos 5 µg/ml, preferentemente por lo menos 10 µg/ml.
- 65 13. Composición farmacéutica que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 12.
- 65 14. Composición según la reivindicación 13 destinada a la prevención o al tratamiento de una infección por VIH.
- 65 15. Composición según la reivindicación 14, caracterizada por que dicha infección por VIH es una infección por VIH

X4-trópico, y/o una infección por VIH X4/R5-trópico.

5 16. Composición según las reivindicaciones 13 a 15, caracterizada por que comprende por lo menos un segundo compuesto anti-VIH seleccionado de entre el grupo que consiste en fármacos antirretrovirales, tales como inhibidores de la proteasa de VIH (PI), inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la transcriptasa inversa de VIH (NRTI/NtRTI), inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa de VIH (NNRTI), inhibidores de entrada de VIH, inhibidores de la integrasa de VIH.

10 17. Composición según la reivindicación 15 o 16, caracterizada por que dicho por lo menos segundo compuesto anti-VIH es el Maraviroc.

18. Procedimiento para el cribado y/o la identificación de moléculas como agentes antivirales antagonistas de CXCR4, que comprende las etapas siguientes:

- 15 a) seleccionar las células que expresan el CXCR4,
- b) incubar dichas células con un anticuerpo, o un de sus fragmentos funcionales o derivados, según las reivindicaciones 1 a 6 o 12, y
- 20 c) evaluar las moléculas sometidas a ensayo respecto a su inhibición potencial de la unión entre el anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, al CXCR4, y
- d) seleccionar las moléculas con capacidad para dicha inhibición.

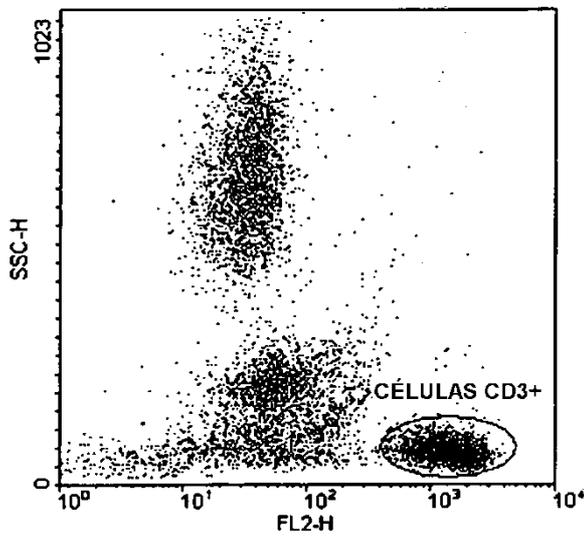


FIGURA 1A

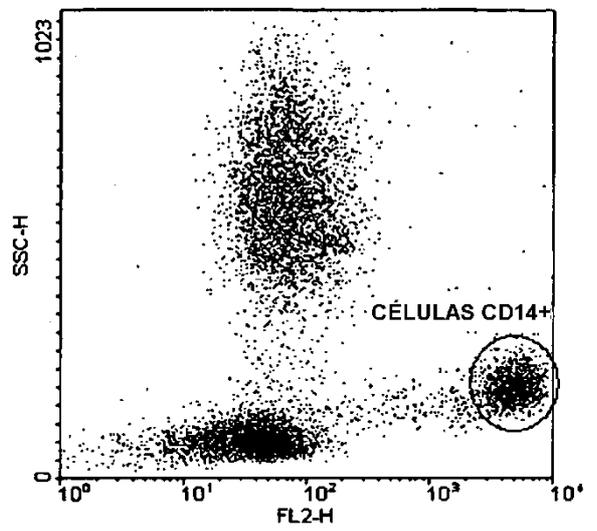


FIGURA 1B

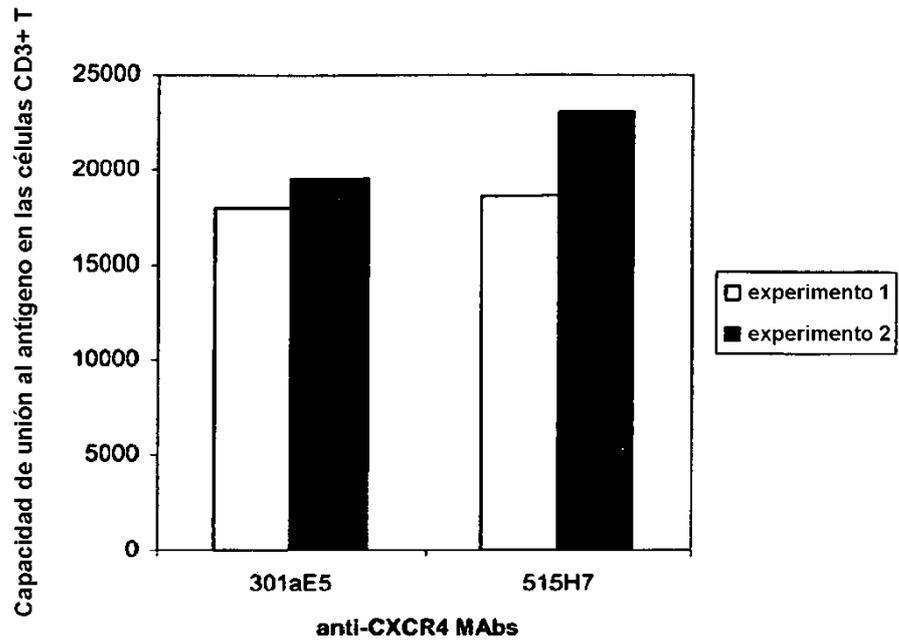


FIGURA 2A

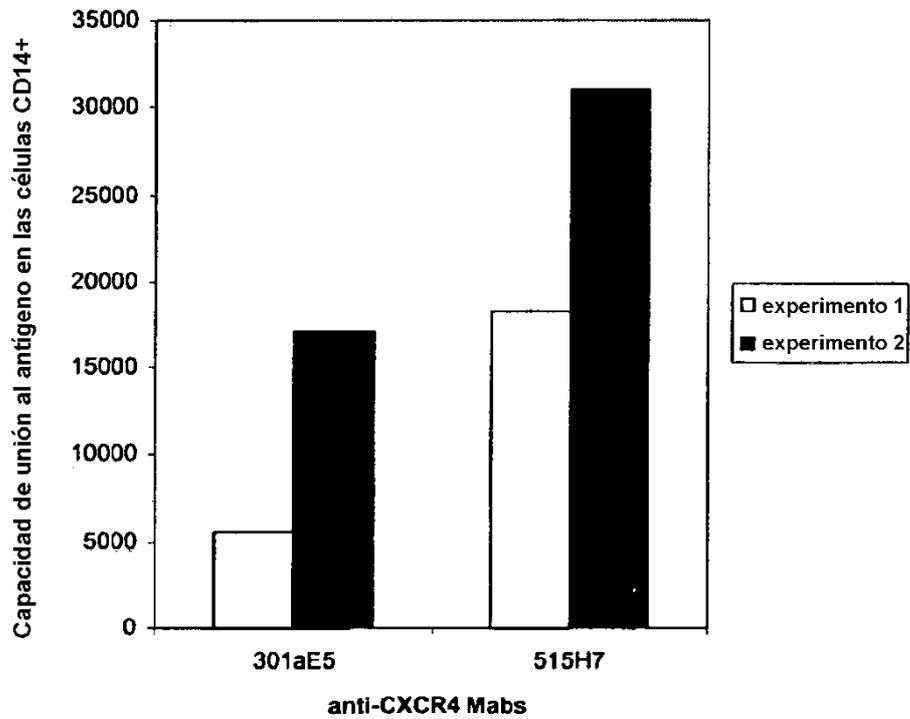


FIGURA 2B

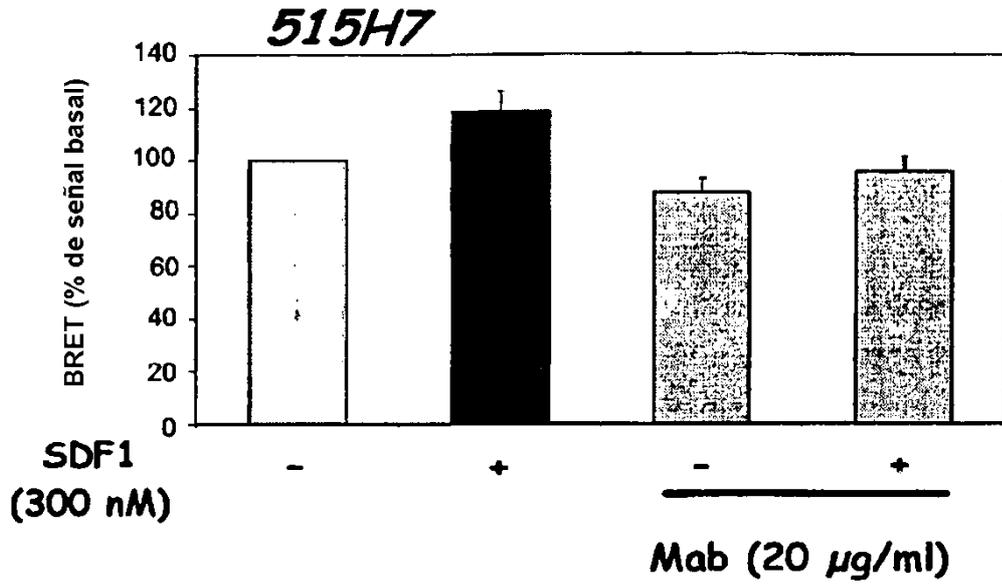


FIGURA 3A

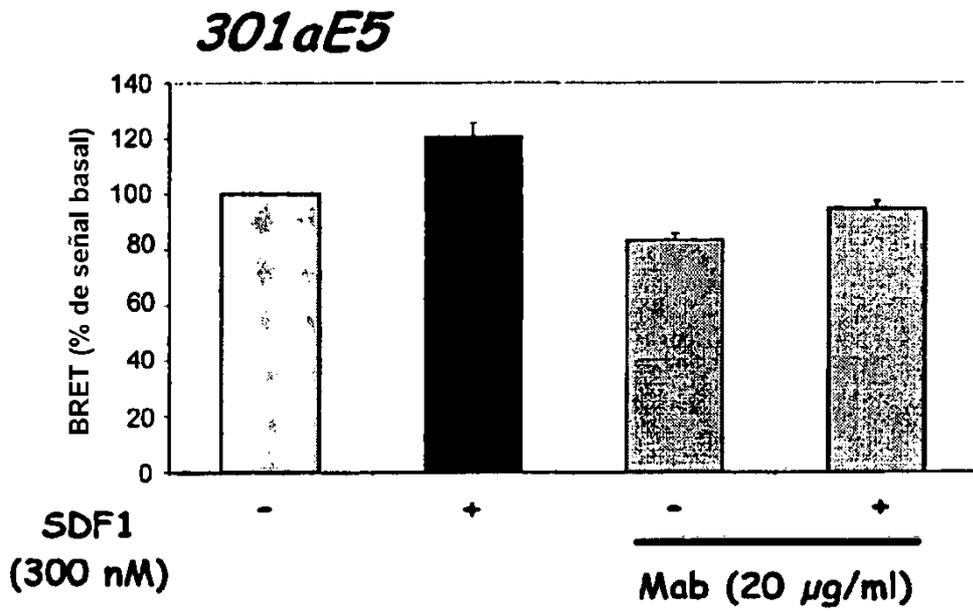


FIGURA 3B

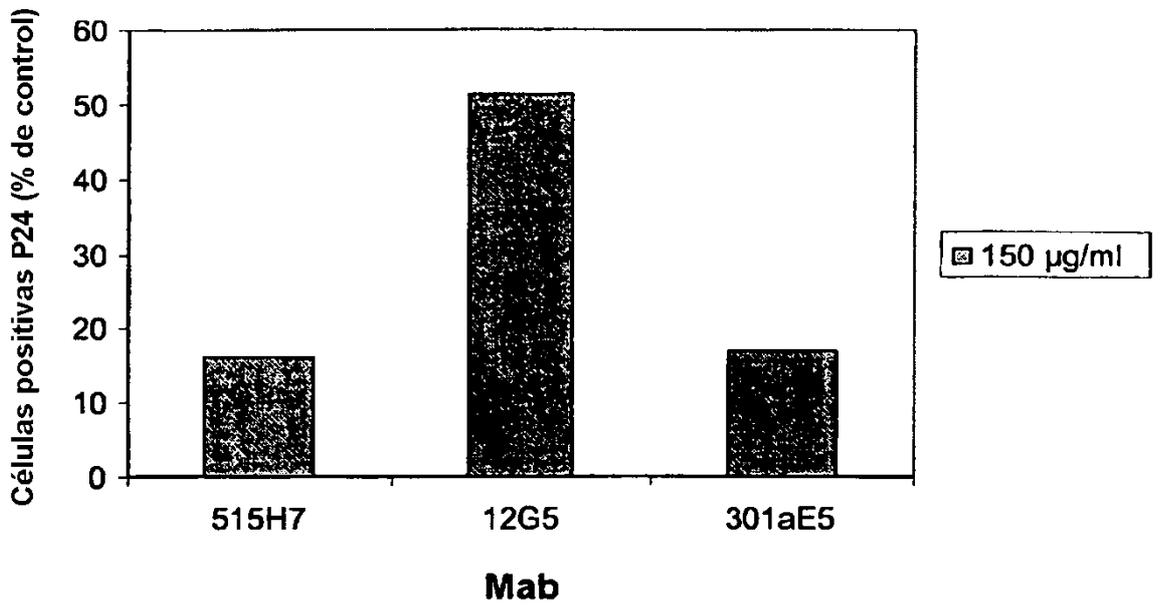


FIGURA 4A

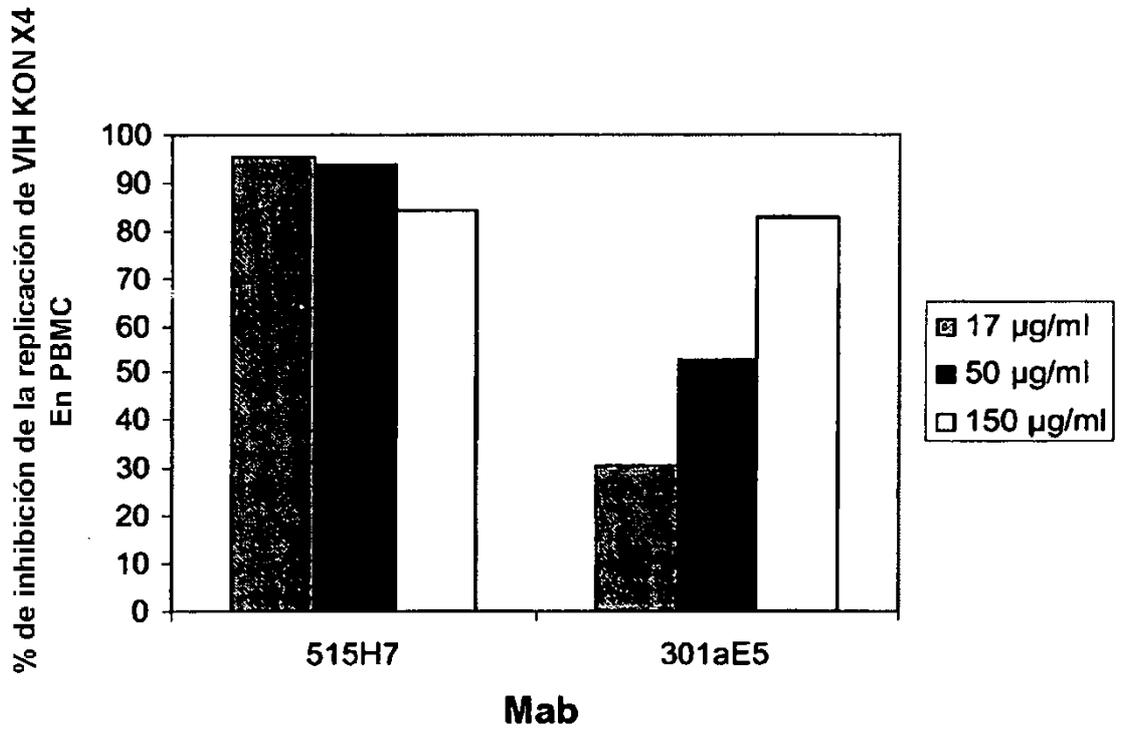


FIGURA 4B

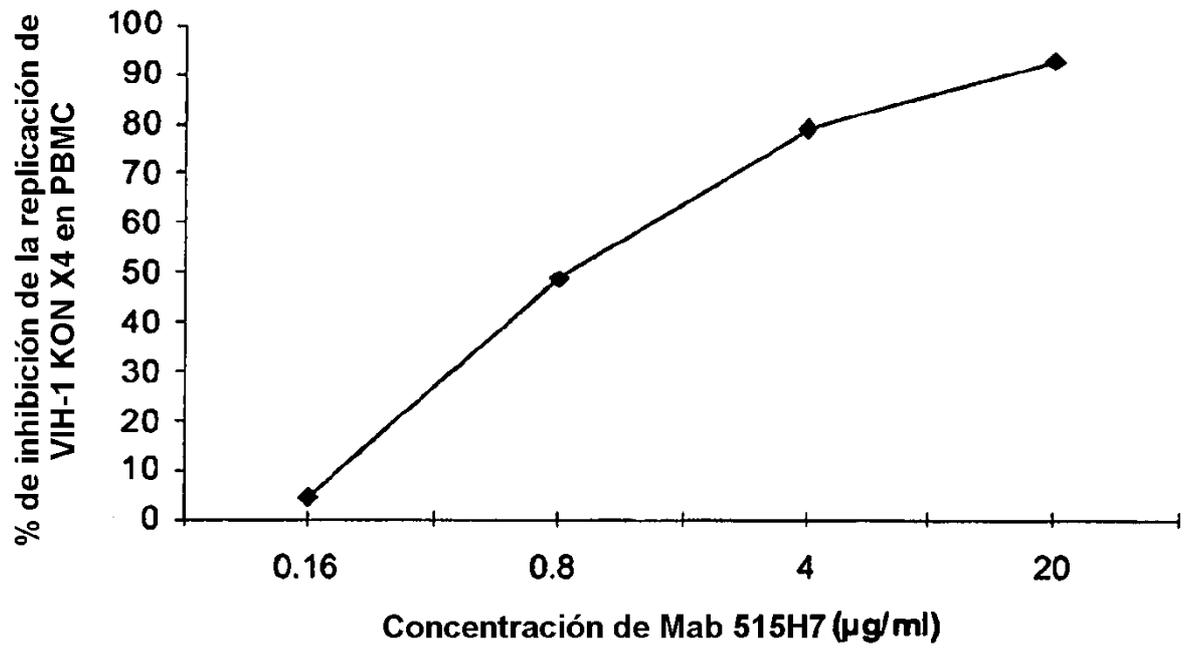


FIGURA 5

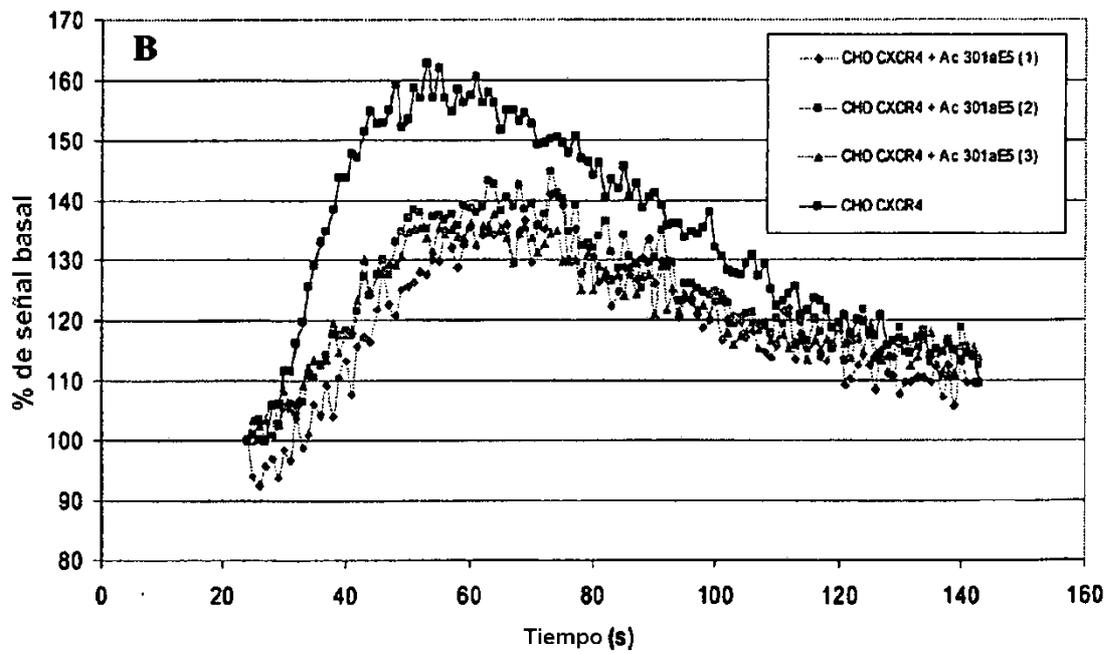
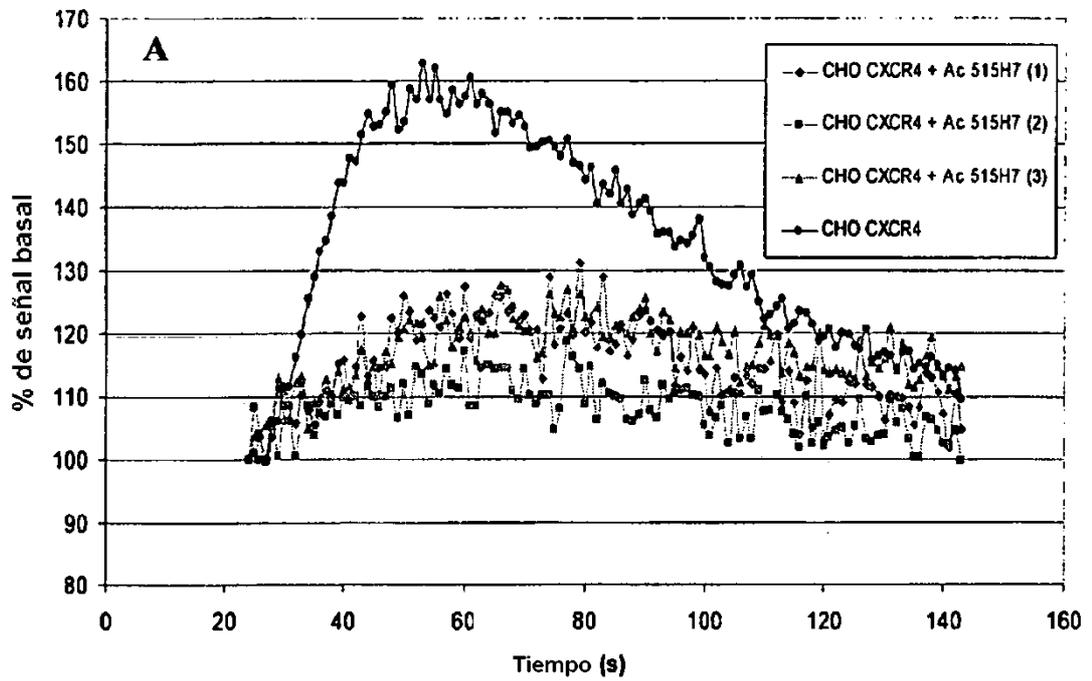


FIGURA 6A et 6B

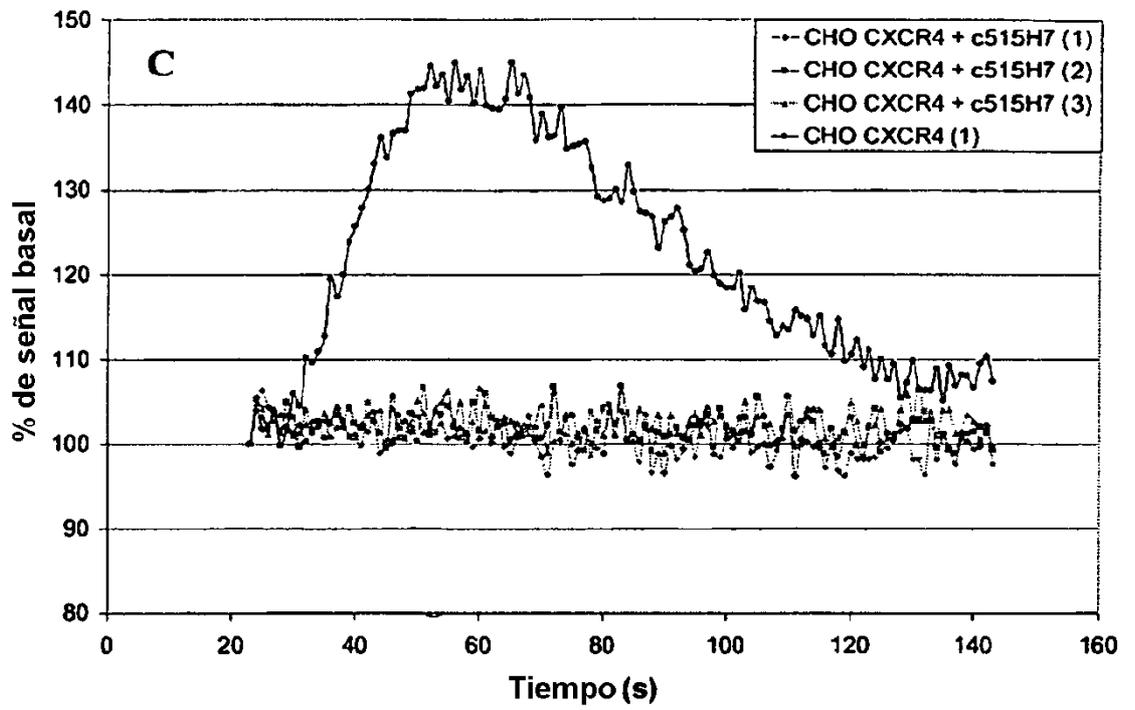


FIGURA 6C

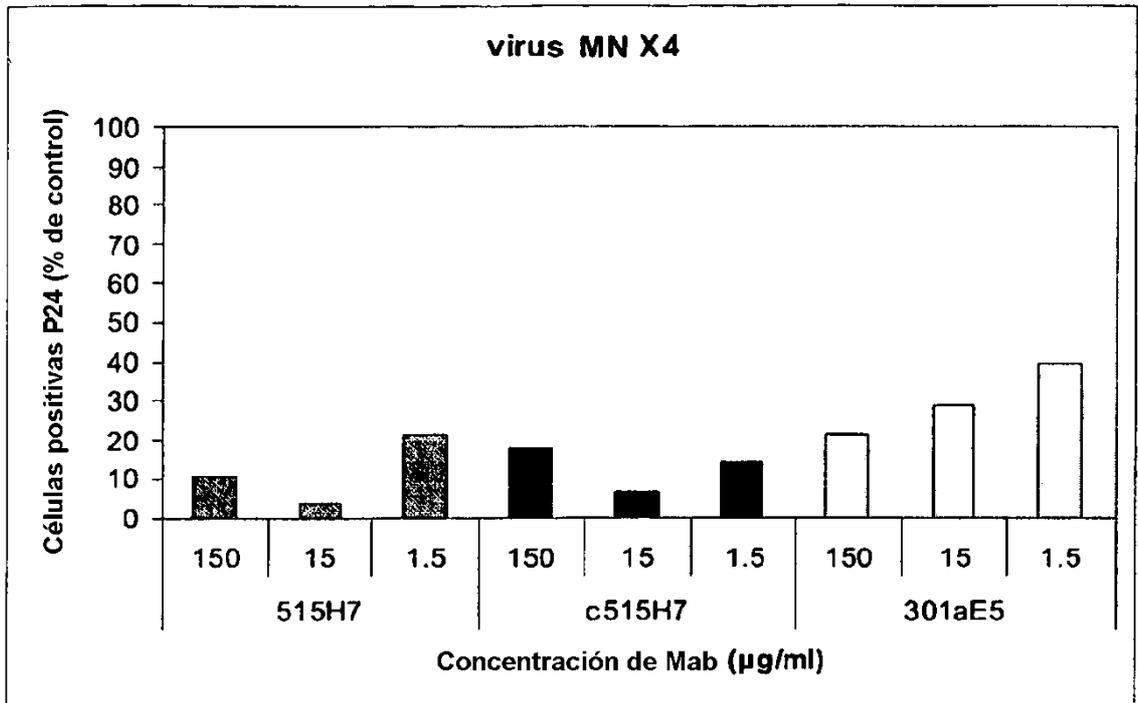


Figura 7

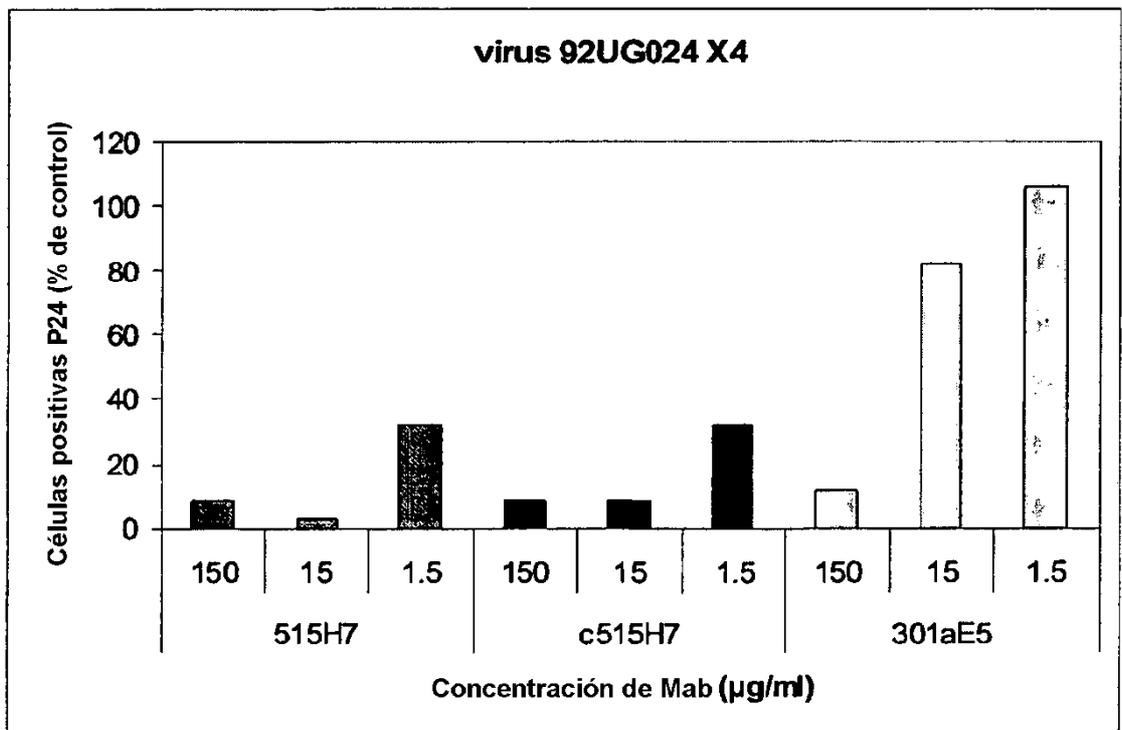


Figura 8

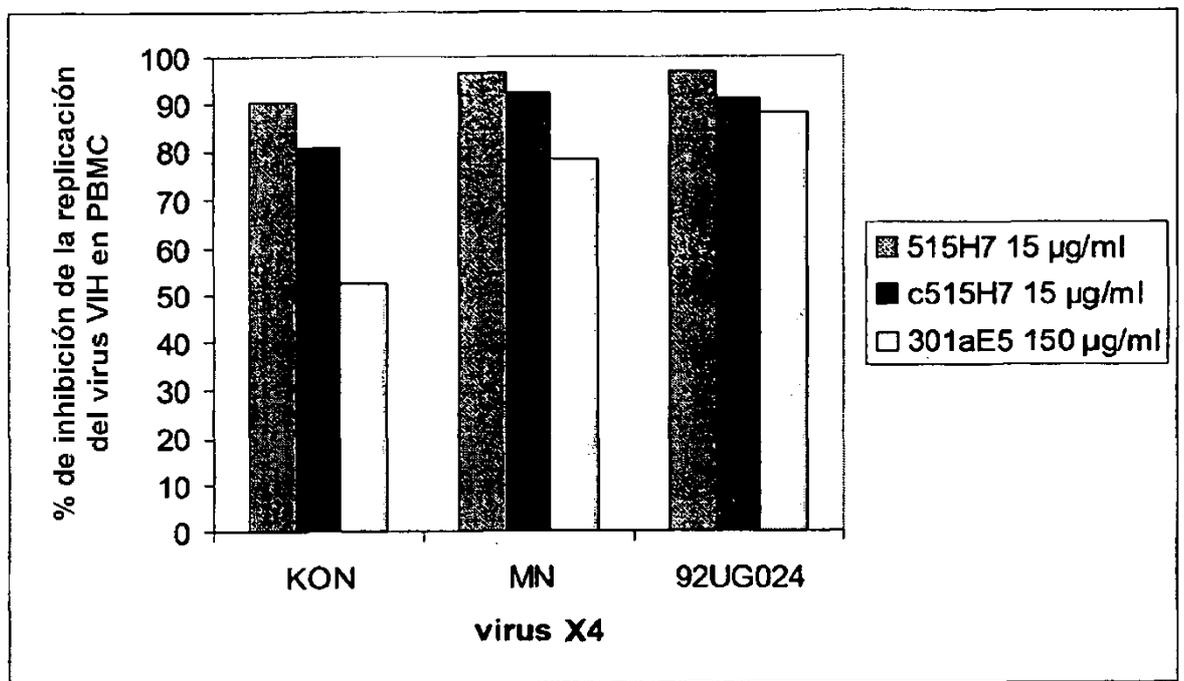


Figura 9

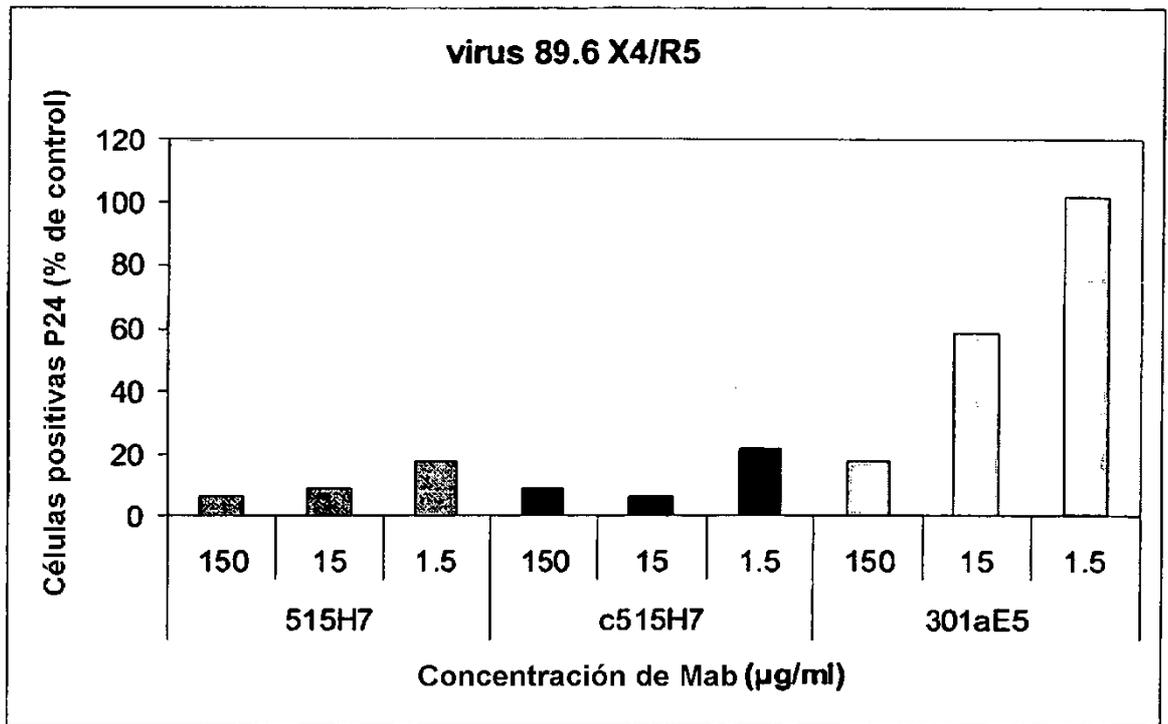


Figura 10

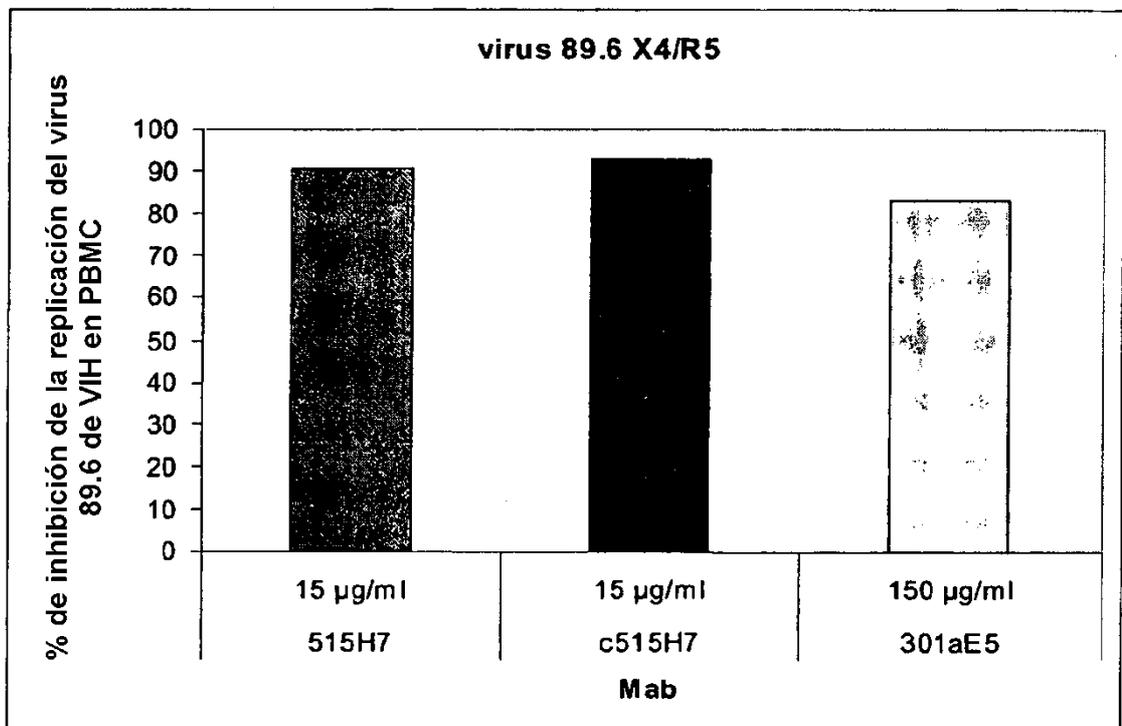


Figura 11

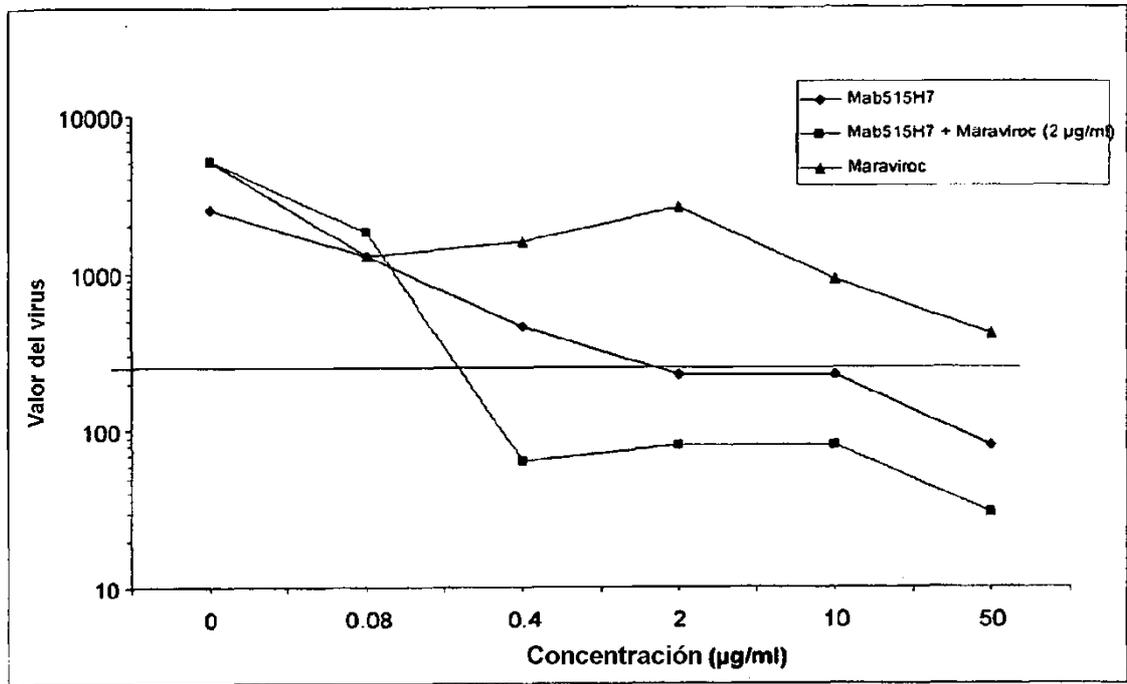


Figura 12

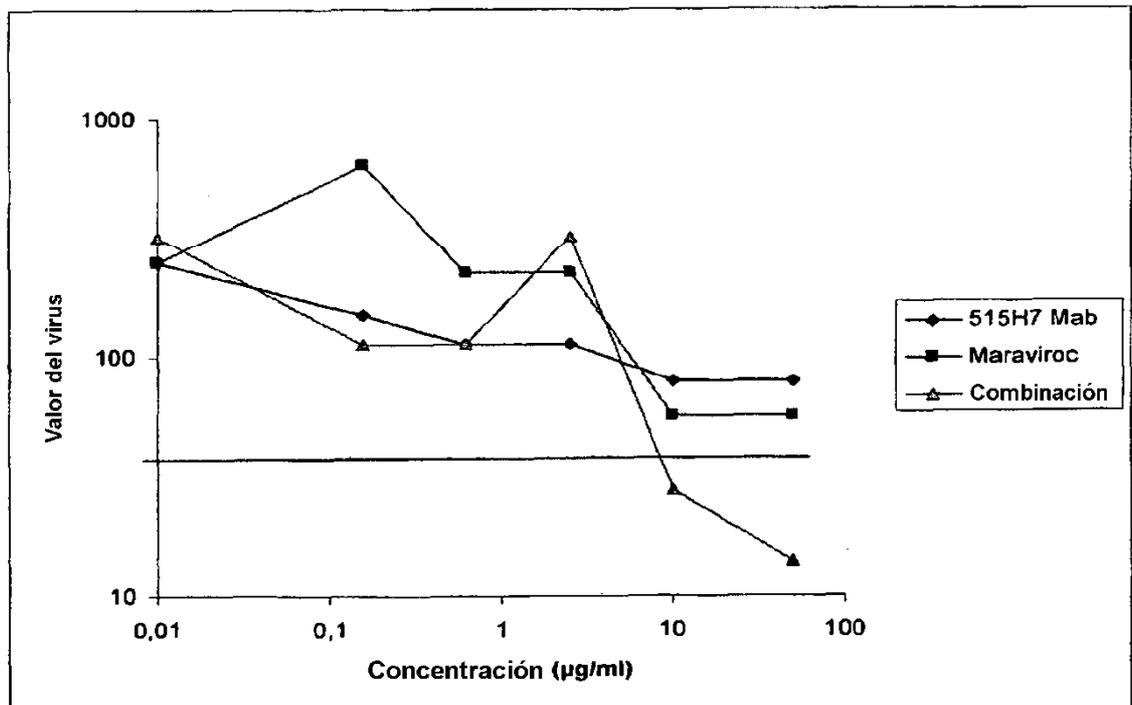


Figura 13

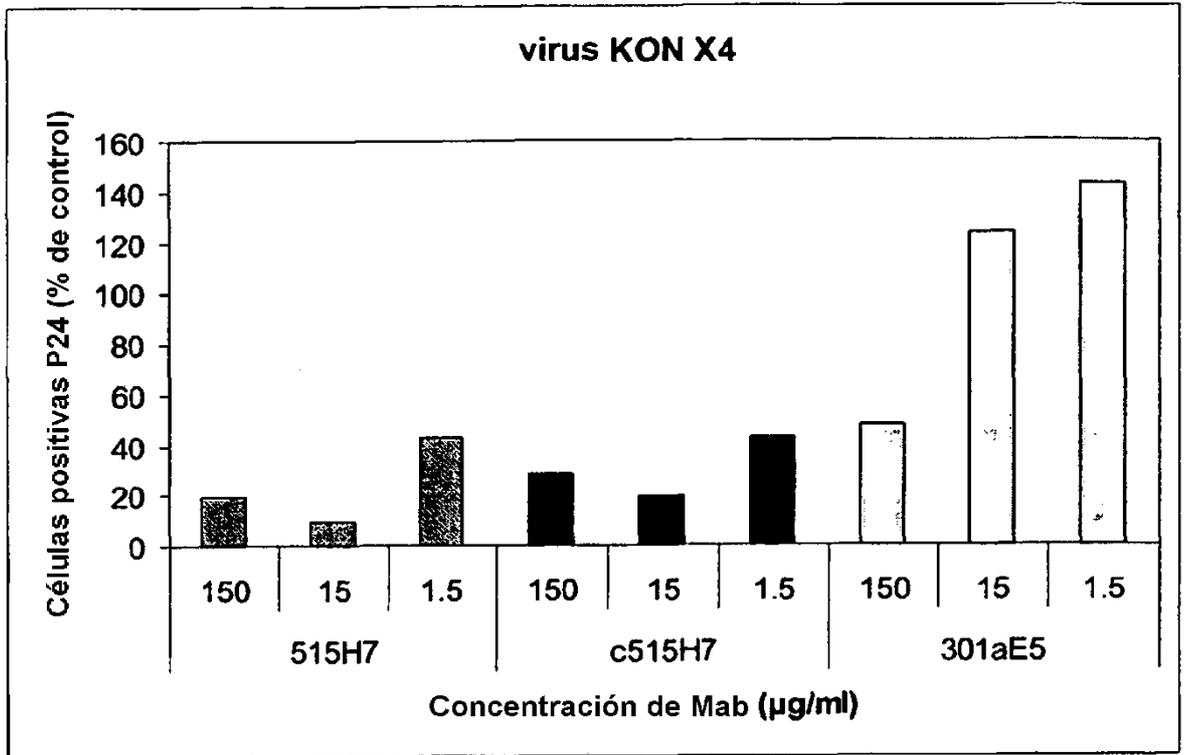


Figura 14

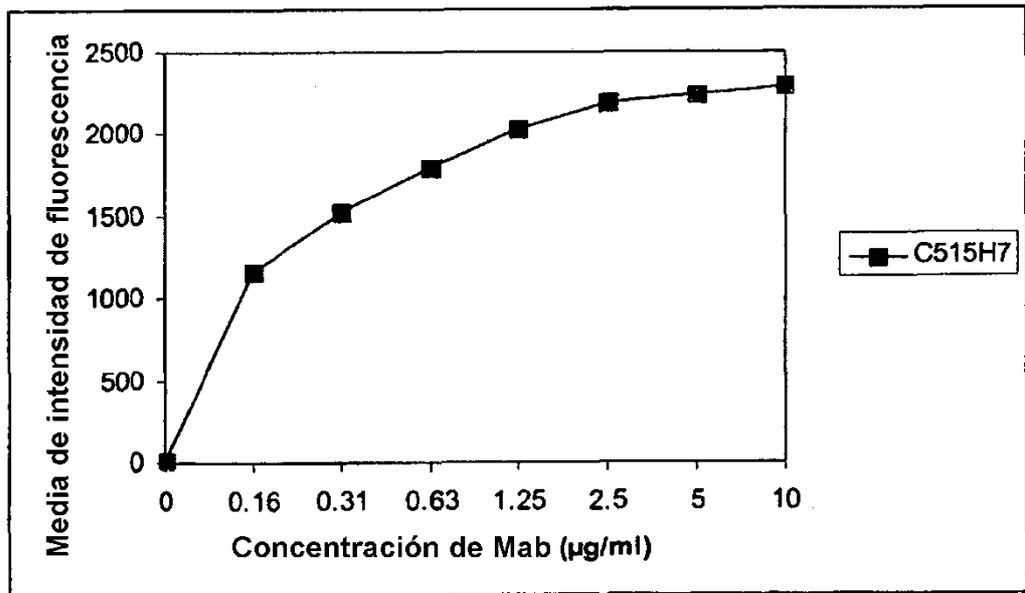


Figura 15

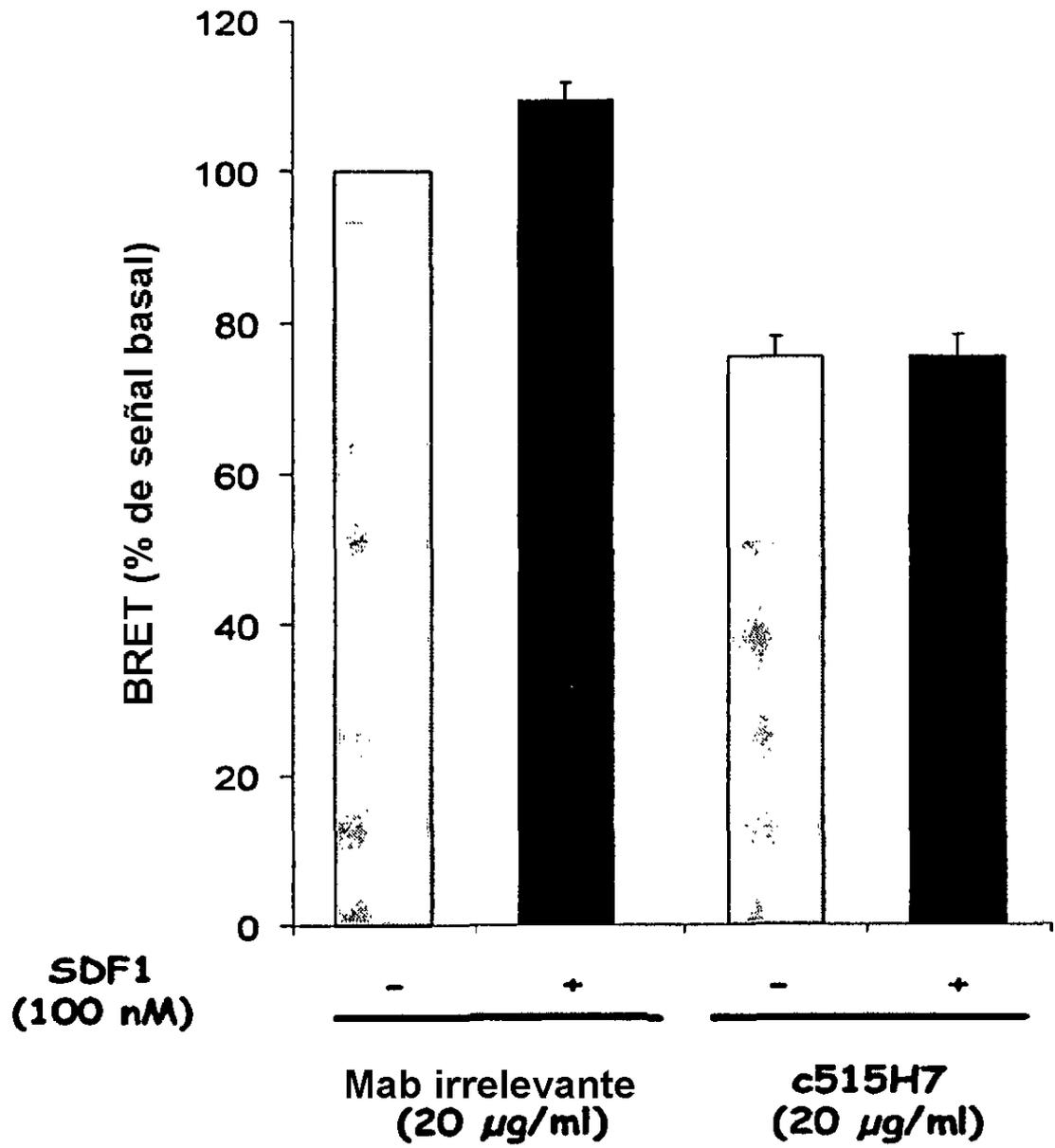


Figura 16

ES 2 534 313 T3

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60		
515H7 VH IGHV3-49*04
	EVNLVESGG	.GLVQPGGSLRLS	CATS	GFTF....TDNY	MSWVRQPPGKALEWL	GF	IRNKANGYTT		
	EVQLVESGG	.GLVQPGRSLRLS	CTAS	GFTF....GDYA	MSWVRQAPGKGLEWV	GF	IRSKAYGGTT		
VH1 VH1 D76N	EVQLVESGG	.GLVQPGRSLRLS	CTAS	GFTF....TDNY	MSWVRQAPGKGLEWV	GF	IRNKANGYTT		
	EVQLVESGG	.GLVQPGRSLRLS	CTAS	GFTF....TDNY	MSWVRQAPGKGLEWV	GF	IRNKANGYTT		

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-115)		FR4-IMGT (116-125)	
	70	80	90	100				
515H7 VH IGHV3-49*04 IGHJ4*01
	DYSASVR	.GRFTISRDN	SQSILYLQMNALRAED	SATYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS		
	EYAASVK	.GRFTISRDDS	KSIAYLQMN	SLKTEDTAVYYC	TR			
						YFDYW	GQGTTLTVSS	
VH1 VH1 D76N	EYAASVK	.GRFTISRDDS	KSIAYLQMN	SLKTEDTAVYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS		
	EYAASVK	.GRFTISRDN	SQSILYLQMN	SLKTEDTAVYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS		

Figura 17

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60		
515H7 VL IGKV4-1*01
	DIVMSQSPSS	LAVSAGEKVT	MSCKSS	QSLFNSRTRK	NY	LAWYQQKPGQSP	KLLIY	WA.....S	
	DIVMTQSPD	SLAVSLGERAT	INCKSS	QSVLYSSN	KNY	LAWYQQKPGQP	PKLLIY	WA.....S	
VL Var2	DIVMTQSPD	SLAVSLGERAT	MSCKSS	QSLFNSRTRK	NY	LAWYQQKPGQSP	KLLIY	WA.....S	
VL Var2.1	DIVMTQSPD	SLAVSLGERAT	MSCKSS	QSLFNSRTRK	NY	LAWYQQKPGQP	PKLLIY	WA.....S	
VL Var2.2	DIVMTQSPD	SLAVSLGERAT	MSCKSS	QSLFNSRTRK	NY	LAWYQQKPGQP	PKLLIY	WA.....S	
VL Var2.3	DIVMTQSPD	SLAVSLGERAT	MSCKSS	QSLFNSRTRK	NY	LAWYQQKPGQP	PKLLIY	WA.....S	

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (106-113)		FR4-IMGT (114-123)	
	70	80	90	100				
515H7 VL IGKV4-1*01 IGKJ1*01
	ARDSGVP	.ARFTGSG..	SETYFTLTISR	VQAEDLAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK		
	TRESGVP	.DRFSGSG..	SGTDFTLTIS	SLQAEDVAVYYC				
					WT	FGQGTKVEIK		
VL Var2	ARDSGVP	.ARFTGSG..	SETYFTLTISR	VQAEDLAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK		
VL Var2.1	ARDSGVP	.DRFSGSG..	SETYFTLTISR	VQAEDLAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK		
VL Var2.2	ARDSGVP	.DRFTGSG..	SETYFTLTISR	VQAEDVAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK		
VL Var2.3	ARDSGVP	.DRFTGSG..	SETYFTLTISR	VQAEDLAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK		

Figura 18

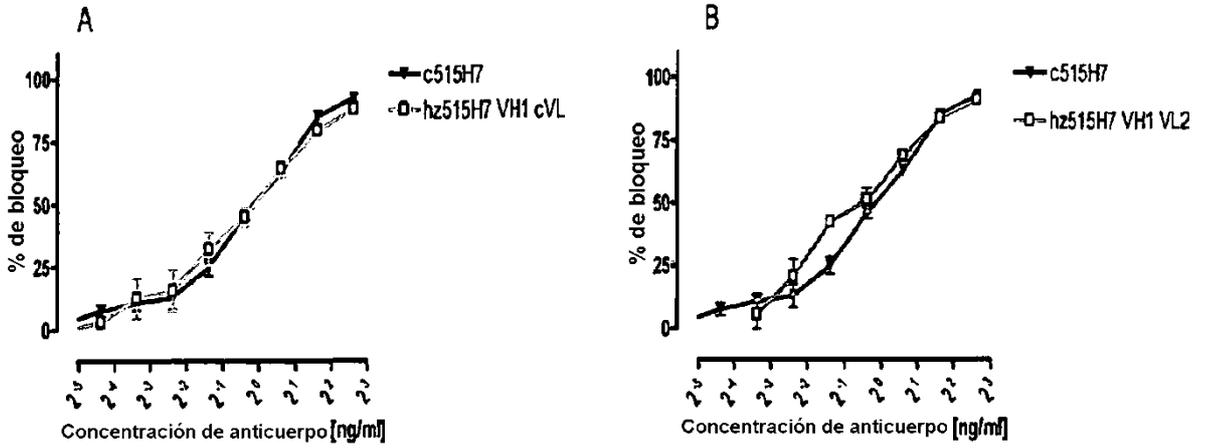


Figura 19

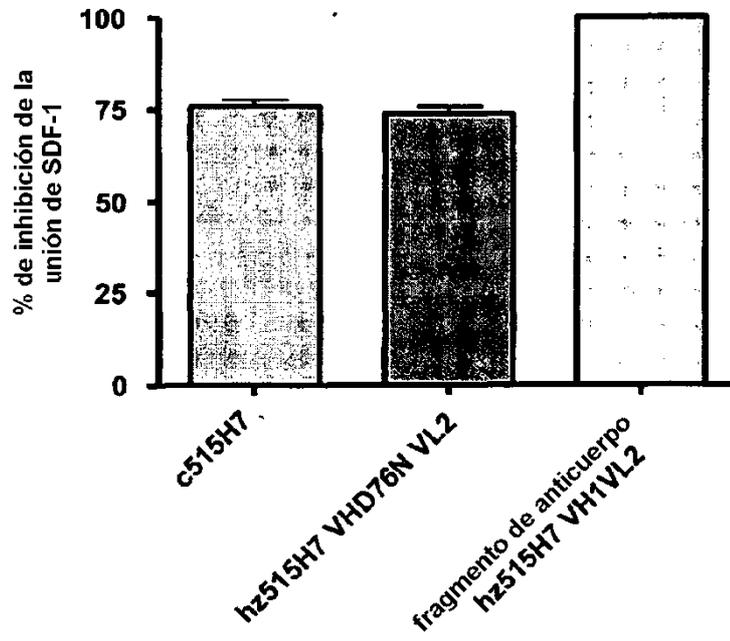


Figura 20

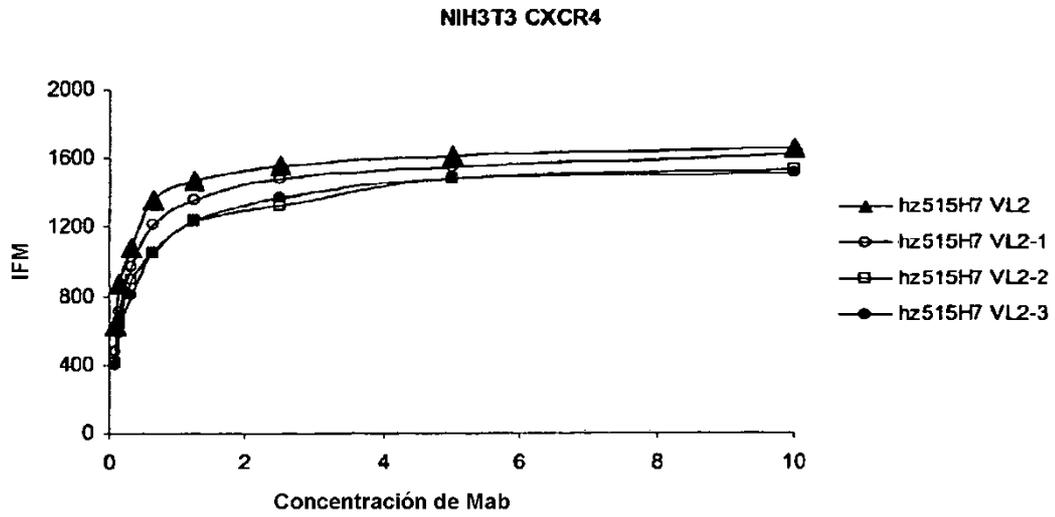


Figura 21

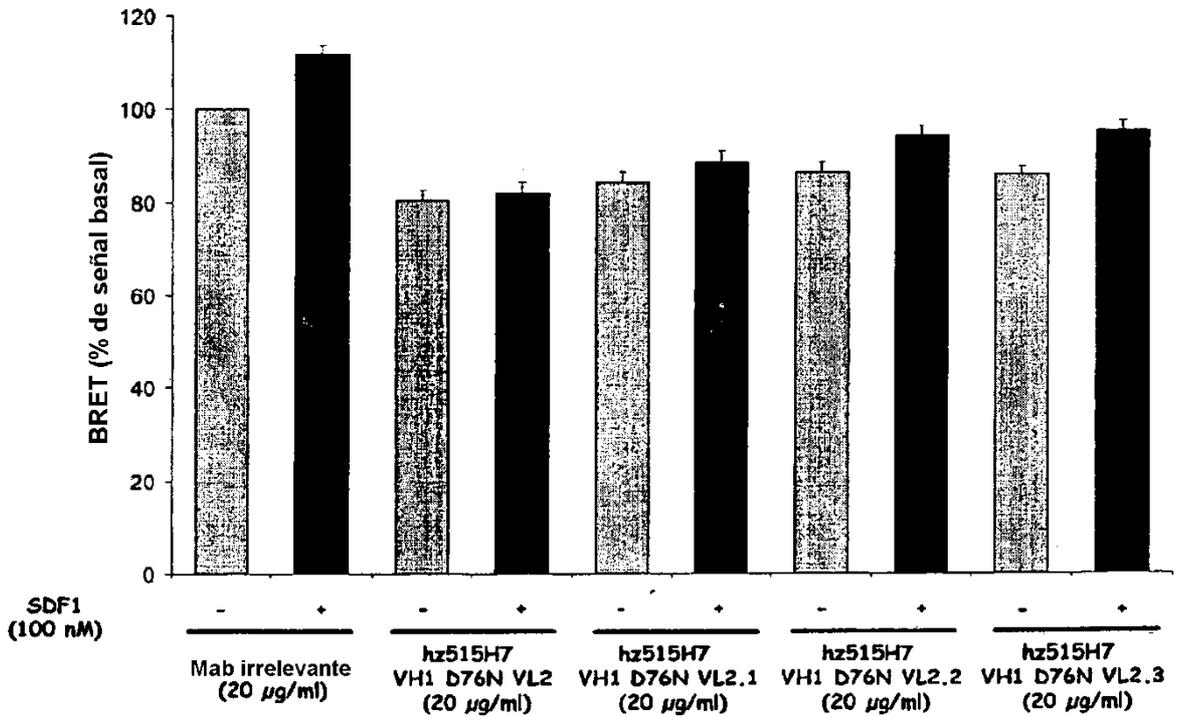


Figura 22