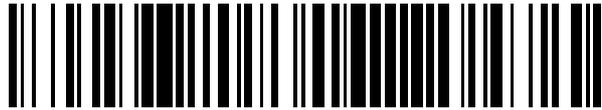


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 177**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2006 E 06787719 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 1915398**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes anti-B7RP1 humanos**

30 Prioridad:

18.07.2005 US 700265 P

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

30.05.2016

73 Titular/es:

AMGEN INC. (50.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US y
E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (50.0%)

72 Inventor/es:

SIU, GERALD;
SHEN, WENYAN;
YOSHINAGA, STEVEN KIYOSHI y
HUANG, HAICHUN

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 572 177 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 neutralizantes anti-B7RP1 humanos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos que se unen a la proteína 1 relacionada con B7 (B7RP1). También se describen composiciones y métodos para tratar enfermedades y trastornos relacionados con inmunosupresión y activación inmunitaria.

Antecedentes de la invención

10 Las células T inician la respuesta inmunitaria, median en funciones efectoras específicas de antígeno, y regulan la actividad de otros leucocitos secretando citocinas. Para la generación de una respuesta inmunitaria de linfocitos T (célula T) apropiada, deben proporcionarse dos señales a la célula T por células presentadoras de antígenos (APC). El antígeno debe presentarse al receptor de células T (TCR) por medio de un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en un acontecimiento que determina la especificidad. Las células T sólo pueden reconocer antígeno presentado sobre una APC. Además del receptor de antígenos, la activación apropiada de células T también requiere la interacción de otras moléculas de superficie celular tanto sobre la célula T como la APC. Estas moléculas, denominadas moléculas coestimuladoras, consisten en un receptor en la célula que responde y un ligando presente sobre la célula inductora. Esta señal coestimuladora, independiente de antígeno, debe suministrarse mediante el acoplamiento de miembros de la familia B7 sobre la APC con sus receptores sobre células T. Una respuesta inmunitaria productiva conduce a proliferación, diferenciación, expansión clonal y función efectora. En ausencia de la segunda señal coestimuladora, las células T experimentan un estado de falta de respuesta específico de antígeno de larga duración, denominado anergia. Experimentos clínicos de fase II han demostrado que el bloqueo de una ruta de coestimulación es eficaz en el tratamiento de psoriasis (Abrams *et al.*, 2000, J Exp Med. 192:681-94; Abrams *et al.*, 1999, J. Clin. Invest. 103:1243-52) y artritis reumatoide (Kremer *et al.*, 2003, New England Journal of Medicine 349: 1907-15), lo que indica que esta estrategia general es una buena diana para la terapia inmunomoduladora.

25 Una molécula B7 coestimuladora particular, la proteína 1 relacionada con B7 (B7RP1), es una proteína transmembrana de tipo 1 con una secuencia señal y un dominio extracelular en el extremo amino-terminal, un dominio extracelular que comprende dos bucles de Ig, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular carboxilo terminal (publicación de solicitud PCT n.º WO 00/46240). B7RP1 se une preferentemente a ICOS (que significa "coestimulador inducible, *inducible costimulator*"; Yoshinga *et al.*, 2000, Int. Immun. 12:1439-1447) expresado sobre la superficie celular de células T. ICOS desempeña un papel importante en la producción de citocinas de tanto tipo 1 como tipo 2 por células T activadas (Coyle *et al.*, 2000, Immunity 13:95-105).

35 B7RP1 es el único ligando expresado de manera constitutiva sobre APC (Yoshinaga *et al.*, 1999, Nature. 402:827-32), mientras que ICOS se expresa sólo sobre células T activadas (McAdam *et al.*, 2000, Journal of Immunology, 165:5035-40). Se requiere señalización dependiente de B7RP1 para la activación de la célula T efectora (es decir, completamente activada), así como su maduración a partir de su precursor virgen (Dong *et al.*, 2003, Journal of Autoimmunity. 21:255-60; Coyle *et al.*, 2000, Immunity. 13:95-105). En consecuencia, se requiere la interacción B7RP1/ICOS para lograr respuestas inmunitarias de recuerdo dependientes de células T apropiadas (Dong *et al.*, 2003, Journal of Autoimmunity. 21:255-60).

Los documentos WO 00/46240 y WO 02/44364 describen anticuerpos que se unen a B7RP1.

40 El documento EP 1 374 902 describe anticuerpos que se unen a ICOS.

Khayyamian *et al.*, 2002, PNAS vol. 99, n.º 9, págs. 6198-6203, describen que el ligando ICOS, expresado sobre células endoteliales humanas, coestimula la secreción de citocinas Th1 y Th2 por células T CD4+ de memoria.

Iwai *et al.*, 2002, J. Immunol., vol. 169, n.º 8, págs. 4332-4339, informan sobre la interacción ICOS-B7h en la patogénesis de artritis inducida por colágeno.

45 Totsuka *et al.*, 2003, Gastroenterology, vol. 124, n.º 2, págs. 410-421, describen un efecto de mejora de un anticuerpo monoclonal anti-ICOS en un modelo murino de colitis crónica.

Richter *et al.*, 2001, J. Biol. Chem., vol. 276, n.º 49, págs. 45686-45693, describen que TNF-alfa regula la expresión de ICOSL sobre células progenitoras CD34(+) durante la diferenciación en células presentadoras de antígenos.

50 Wahl *et al.*, 2002, J. Am. Soc. Nephrol., vol. 13, n.º 6, págs. 1517-1526, informan sobre la expresión epitelial en túbulos renales de B7RP-1.

Wahl *et al.*, 2003, Inflammation, vol. 27, n.º 4, págs. 191-200, describen que la ruta de B7RP-1/ICOS está regulando de manera negativa la activación de células T por células B.

Los intentos actuales de interferir con la ruta de células T coestimuladoras se han centrado principalmente en

5 polipéptidos coestimuladores que bloquean la activación de célula T sólo, pero no se han centrado en la activación y maduración. En consecuencia, estas terapias proporcionan una inhibición general de la función de células T. En cambio, el bloqueo de la interacción B7RP1/ICOS proporciona una inhibición más específica de la función de células T afectando sólo a células T efectoras maduras. Por tanto, el bloqueo de la interacción B7RP1/ICOS en la práctica clínica es altamente deseable porque proporcionaría un perfil de efectos secundarios más limitado que las terapias de coestimulación que bloquean sólo la activación de células T vírgenes.

Sumario de la invención

10 La divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína 1 relacionada con B7 (B7RP1). En un aspecto, los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoclonales humanos que neutralizan las actividades biológicas de B7RP1 y son particularmente útiles para inhibir parcial o completamente la actividad coestimuladora inmunitaria de B7RP1. La divulgación también proporciona células, particularmente células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales de la divulgación. En aspectos particulares, los anticuerpos de la divulgación se unen específicamente a la región H o D de B7RP1 tal como se describe en el presente documento.

15 La divulgación proporciona además proteínas de fusión que comprenden la secuencia de una región Fc de anticuerpo y una o más secuencias identificadas como SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO. 40. Tales moléculas pueden prepararse usando métodos tal como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 00/24782. Tales moléculas pueden expresarse, por ejemplo, en células de mamífero (por ejemplo células de ovario de hámster chino) o células bacterianas (por ejemplo células de *E. coli*).

20 En determinados aspectos, la divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada seleccionada de regiones constantes de cadenas pesadas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE o cualquier variación alélica de las mismas (tal como se comenta en Kabat *et al*, 1991, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH n.º 91-3242), y la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO. 14, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de las mismas. Un anticuerpo de la divulgación comprende o bien una secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG2 tal como se expone en SEQ ID NO: 41 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, o una secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 tal como se expone en SEQ ID NO: 42 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma. En determinados aspectos, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o preferiblemente anticuerpos monoclonales humanos.

35 En determinados aspectos, la divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena ligera comprende una región constante que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 43 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO. 6, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma. En determinados aspectos, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o preferiblemente anticuerpos monoclonales humanos.

45 En determinados aspectos, los anticuerpos de la divulgación comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma. En otros aspectos, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

50 En otros aspectos, los anticuerpos de la divulgación comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 9, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma. En otros aspectos, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

55 En aspectos adicionales, la cadena pesada comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO. 40, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma. En todavía aspectos adicionales, la cadena ligera comprende al menos una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO. 26, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

La divulgación también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a B7RP1, en los que la cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y la cadena ligera comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

Además, la divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a B7RP1, en los que la cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 9, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y la cadena ligera comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

En determinados aspectos, la divulgación también proporciona anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, o al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO. 14, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, o al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO. 6, en los que el anticuerpo se une específicamente a B7RP1.

La divulgación también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a B7RP1, en los que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 45, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

La divulgación también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a B7RP1, en los que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 47, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 48, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

En determinados aspectos, la divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en los que la región variable de cadena pesada comprende al menos una CDR que tiene una secuencia que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, o al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO. 40, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en los que la región variable de cadena ligera comprende al menos una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, o al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO. 26, en los que el anticuerpo se une específicamente a B7RP1.

La divulgación también proporciona anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos Fv de cadena sencilla, anticuerpos F(ab), anticuerpos F(ab)' y anticuerpos (Fab')₂.

En aspectos particulares, la divulgación proporciona una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO. 26, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

Además, la divulgación proporciona una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO. 40, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

La divulgación también se refiere a anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente a B7RP1, en los que el anticuerpo comprende: (a) regiones de marco de cadena pesada humana, una región CDR1 de cadena pesada humana, una región CDR2 de cadena pesada humana y una región CDR3 de cadena pesada humana; y (b) regiones de marco de cadena ligera humana, una región CDR1 de cadena ligera humana, una región CDR2 de cadena ligera humana y una región CDR3 de cadena ligera humana. En determinados aspectos, la región CDR1 de

- cadena pesada humana puede ser la región CDR1 de cadena pesada tal como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO: 27, 30 ó 35 y la región CDR1 de cadena ligera humana puede ser la región CDR1 de cadena ligera mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 15, 18 ó 24. En otros aspectos, la región CDR2 de cadena pesada humana puede ser la región CDR2 de cadena pesada tal como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO: 28, 31, 33, 36 ó 39, y la región CDR2 de cadena ligera humana puede ser la CDR2 de cadena ligera tal como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO: 16, 19 ó 21. En todavía otros aspectos, la región CDR3 de cadena pesada humana es la región CDR3 de cadena pesada tal como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO: 29, 32, 34, 37, 38 ó 40, y la región CDR3 de cadena ligera humana es la región CDR3 de cadena ligera tal como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO: 17, 20, 22, 23, 25 ó 26.
- Los anticuerpos de la divulgación se caracterizan por la capacidad de unirse específicamente a B7RP1. Además, los anticuerpos de la divulgación tienen la capacidad de antagonizar al menos una actividad *in vitro* y/o *in vivo* asociada con polipéptidos de B7RP1. La invención proporciona anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana aislados con alta afinidad de unión a polipéptidos de B7RP1, en los que los anticuerpos se unen a polipéptido de B7RP1 humano y se disocian del polipéptido de B7RP1 humano con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, o menos, tal como se determina usando KinExA, o que inhiben la supervivencia inducida por B7RP1 en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CE_{50} de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o menos.
- La divulgación también proporciona anticuerpos humanos aislados o un fragmento de unión a antígeno o fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos que se unen específicamente a B7RP1, en los que los anticuerpos o fragmentos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, en los que:
- la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 27, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 28, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 29;
 - la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 30, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 31, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 32;
 - la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 27, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 33, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 34;
 - la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 35, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 36, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 37;
 - la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 27, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 33, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 38; o
 - la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 35, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 39, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 40.
- La divulgación también proporciona un anticuerpo humano aislado o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo que se une específicamente a B7RP1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, en el que:
- la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 15, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 16, y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 17;
 - la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 18, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 19, y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 20;
 - la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 15, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 21, y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 22;
 - la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 18, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 19, y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 23;

e) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 24, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 16, y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 25; o

5 f) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 24, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 16, y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 26.

La divulgación también proporciona anticuerpos que compiten con la unión de los anticuerpos descritos en el presente documento a B7RP1. En determinados aspectos, un anticuerpo competitivo de la divulgación compite con la unión de un anticuerpo que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-40 a B7RP1 humana.

10 También son parte de la divulgación secuencias de polinucleótido que codifican para anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana, vectores que comprenden las secuencias de polinucleótido que codifican para anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana, células huésped transformadas con vectores que incorporan polinucleótidos que codifican para anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana, formulaciones que comprenden anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana y métodos de preparación y uso de los mismos.

15 La divulgación también proporciona métodos para detectar B7RP1 en una muestra biológica, que comprenden la etapa de poner en contacto la muestra con un anticuerpo de la divulgación o fragmento de unión a antígeno del mismo. Un anticuerpo anti-B7RP1 de la divulgación puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) {véase, Sola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of
20 Techniques, págs. 147-158, CRC Press, Inc.) para la detección y cuantificación de B7RP1. Los anticuerpos pueden unirse a B7RP1 con una afinidad que es apropiada para el método de ensayo que está empleándose.

Además, la divulgación proporciona métodos para tratar una enfermedad asociada con un aumento de la producción de B7RP1, aumento de la sensibilidad a B7RP1, y/o enfermedades relacionadas con el control de respuestas de células T, que comprenden la etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición
25 farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo de la divulgación o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo a un individuo que lo necesita.

Resultarán evidentes aspectos de la divulgación a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1A representa la secuencia de región variable del anticuerpo 16H (SEQ ID NO: 7) y la correspondiente secuencia de línea germinal de región variable de 16H (16Hg) (SEQ ID NO: 8).

La figura 1B representa los resultados de ensayos de coestimulación usando anticuerpo anti-CD3 y proteína de fusión hB7RP1-Fc que demuestran que 16Hg conserva sus actividades biológicas en comparación con 16H.

La figura 2 muestra los resultados de ensayos de unión Biacore® con los anticuerpos 16H, 16Hg y 5D.

La figura 3 muestra los resultados del ensayo de unión KinExA con el anticuerpo 5D.

35 La figura 4 muestra los resultados del ensayo de unión KinExA con el anticuerpo 2H.

La figura 5 muestra los resultados del ensayo de unión KinExA con el anticuerpo de línea germinal 2H (2Hg).

La figura 6 representa los resultados de ensayos de unión-competición que muestran que el anticuerpo 16H separa por competición la unión de ICOS-Fc sobre B7RP-1, analizada mediante citometría de flujo.

La figura 7 representa un resumen del análisis de polimorfismos de un solo nucleótido de B7RP-1 (SNP).

40 La figura 8 representa un resumen del análisis de un conjunto de anticuerpos monoclonales anti-B7RP humana en ensayos ELISA de competición. Los valores mostrados son CI_{50} para la inhibición de la unión de una proteína de fusión ICOS-Fc.

La figura 9A muestra la tinción fluorescente del dominio extracelular (ECD) de B7RP1 con los anticuerpos 16H, 5D e ICOS marcados.

45 La figura 9B muestra la eficacia de unión similar de los anticuerpos 16H y 5D a una variante de SNP de B7RP1.

La figura 9C representa los resultados de ensayos de coestimulación con los anticuerpos 16H o 5D y variantes de SNP.

La figura 10A muestra los resultados de ensayos de coestimulación en placa con los anticuerpos monoclonales 1B7v2 en comparación con varios anticuerpos monoclonales anti-B7RP-1 murina.

Las figuras 10B, 10C y 10D muestran los resultados de experimentos de exposición a antígeno, analizados para detectar IgM (figura 10B), IgG2a (figura 10C) e IgG1 (figura 10D) en suero específicas de antígeno.

La figura 11 representa resultados de ELISA que demuestran que los niveles de IL-5 en suero se reprimen por los anticuerpos 1B7v2.

- 5 La figura 12A muestra que los anticuerpos 16H pueden unirse a B7RP1 de mono cynomolgus (panel derecho) y B7RP1 de ser humano (panel izquierdo).

La figura 12B muestra que los anticuerpos 16H, 16Hg y 5D pueden inhibir la activación de células T dependiente de B7RP1/ICOS de mono cynomolgus.

- 10 La figura 13A representa los valores de título medios de grupo y mono cynomolgus individual en el día 53 y el día 57 tras la exposición secundaria con toxoide tetánico en el día 42 en animales tratados con los anticuerpos 16H.

La figura 13B representa los valores de título medios de grupo y mono cynomolgus individual en el día 53 y el día 57 tras la exposición secundaria con toxoide tetánico en el día 42 en animales tratados con los anticuerpos 5D.

Descripción detallada de determinadas realizaciones

- 15 Los encabezamientos de sección usados en el presente documento son para fines de organización sólo y no deben interpretarse que limitan la materia descrita.

Definiciones

- 20 Pueden usarse técnicas convencionales para la síntesis de oligonucleótidos, ADN recombinante, y transformación y cultivo tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección). Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o tal como se logra comúnmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse generalmente según métodos bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y comentan a lo largo de toda la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook *et al*, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. A menos que se proporcionan definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica de síntesis y química médica y farmacéutica descritos en el presente documento son los que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. De manera similar, pueden usarse técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéuticas, y tratamiento de pacientes.

- 30 Tal como se utiliza según la presente divulgación, los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, debe entenderse que tienen los siguientes significados. Las expresiones “propiedad biológica”, “característica biológica”, y el término “actividad” en referencia a un anticuerpo de la presente invención se usan indistintamente en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, afinidad y especificidad por epítopos (por ejemplo, unión de anticuerpo humano anti-B7RP1 humana a B7RP1 humana), capacidad para antagonizar la actividad del polipéptido seleccionado como diana (por ejemplo, actividad de B7RP1), la estabilidad *in vivo* del anticuerpo, y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo. Otras propiedades o características biológicas identificables de un anticuerpo reconocido en la técnica incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada, (es decir, con homólogos no humanos de B7RP1, o con otras proteínas o tejidos, en general), y la capacidad para conservar altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero. Las propiedades o características mencionadas anteriormente pueden observarse o medirse usando técnicas reconocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, ELISA, ELISA de competición, análisis de resonancia de plasmón superficial, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, ejemplo 2), y inmunohistoquímica con secciones de tejido de diferentes fuentes incluyendo ser humano, primate o cualquier otra fuente apropiada. Se describen en mayor detalle actividades y propiedades biológicas particulares de anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana en los ejemplos más adelante.

- 45 El término “polinucleótido aislado” tal como se usa en el presente documento significará un polinucleótido de origen de ARN, ADNc, ADN genómico o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el polinucleótido aislado (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido con el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

- 50 El término “polinucleótido” tal como se le hace referencia en el presente documento significa polímeros de ácido nucleico monocatenarios o bicatenarios de al menos 10 nucleótidos de longitud. En determinados aspectos, los nucleótidos que comprende el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como bromuridina, modificaciones de ribosa tales como arabinósido y 2',3'-didesoxirribosa y modificaciones de unión entre nucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato y fosforoamidato. El término “polinucleótido” incluye específicamente las formas mono y bicatenarias de ADN o ARN.

El término “oligonucleótido” al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos que se producen de manera natural y nucleótidos modificados unidos entre sí mediante enlaces oligonucleotídicos que se producen de manera natural, y/o que no se producen de manera natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto del polinucleótido que comprende miembros que son generalmente monocatenarios y tienen una longitud de 200 nucleótidos o menos. En determinados aspectos, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 nucleótidos de longitud. En determinados aspectos, los oligonucleótidos tienen de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, por ejemplo para su uso en la construcción de un mutante genético. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido con referencia a una secuencia que codifica para proteína.

El término “nucleótidos que se producen de manera natural” incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término “nucleótidos modificados” incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término “enlaces oligonucleotídicos” incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato, fosforoamidato, y similares. Véanse, por ejemplo, LaPlanche *et al.*, 1986, Nucl. Acids Res., 14:9081; Stec *et al.*, 1984, J. Am. Chem. Soc., 106:6077; Stein *et al.*, 1988, Nucl. Acids Res., 16:3209; Zon *et al.*, 1991, Anti-Cancer Drug Design, 6:539; Zon *et al.*, 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press, Oxford, Inglaterra; Stec *et al.*, patente estadounidense n.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman, 1990, Chemical Reviews, 90:543. Un oligonucleótido puede incluir un marcador detectable para permitir la detección del oligonucleótido o la hibridización del mismo.

El término “proteína aislada” al que se hace referencia en el presente documento significa que una proteína sujeto (1) está libre de al menos algunas otras proteínas con las que se encontraría en la naturaleza, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de los polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que está asociado en la naturaleza, (5) no está asociada (por interacción covalente o no covalente) con partes de una proteína con la que la “proteína aislada” está asociada en la naturaleza, (6) está operativamente asociada (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociada en la naturaleza, o (7) no se produce en la naturaleza. Una proteína aislada de este tipo puede codificarse por ARNm, ADNc, ADN genómico u otro ARN, de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso (terapéutico, de diagnóstico, profiláctico, de investigación u otro).

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otras sustancias proteínicas o no proteínicas. En determinados aspectos, el anticuerpo se purifica (1) hasta más del 95% o más del 99% en peso de anticuerpo tal como se determina mediante el método de Lowry, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción de plata o azul de Coomassie. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente.

Los términos “polipéptido” o “proteína” significan moléculas que tienen la secuencia de proteínas nativas, es decir, proteínas producidas por células que se producen de manera natural y específicamente no recombinantes, o células modificadas por ingeniería genética o recombinantes, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen deleciones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos “polipéptido” y “proteína” engloban específicamente anticuerpos anti-B7RP1, o secuencias que tienen deleciones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un anticuerpo anti-B7RP1.

El término “fragmento de polipéptido” se refiere a un polipéptido que tiene una deleción amino-terminal, una deleción carboxilo-terminal y/o una deleción interna. En determinadas realizaciones, los fragmentos tienen de al menos 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. Se apreciará que en determinadas realizaciones, los fragmentos tienen al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ó 450 aminoácidos de longitud. Los fragmentos de polipéptido particularmente útiles incluyen dominios funcionales, incluyendo dominios de unión, particularmente dominios de unión a antígeno, especialmente en los que el antígeno es un epítipo de B7RP1 humana. En el caso de un anticuerpo anti-B7RP1, los fragmentos útiles incluyen pero no se limitan a una región CDR, un dominio variable de una cadena pesada o ligera, una parte de una cadena de anticuerpo tan sólo su región variable que incluye dos CDR, y similares.

El término “agente de unión específica” se refiere a una molécula que se produce de manera natural o que no se produce de manera natural que se une específicamente a una diana. Los ejemplos de agentes de unión específica incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos. En determinados aspectos, un agente de unión específica es un anticuerpo.

El término “agente de unión específica a B7RP1” se refiere a un agente de unión específica que se une específicamente a cualquier parte de B7RP1. En determinados aspectos, un agente de unión específica a B7RP1 es un anticuerpo que se une específicamente a B7RP1.

5 A modo de ejemplo, un anticuerpo “se une específicamente” a una diana si el anticuerpo, cuando está marcado, puede separarse por competición de su diana por el anticuerpo no marcado correspondiente.

10 El término “fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional” tal como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de polipéptido que contiene al menos las CDR de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la divulgación puede unirse a un antígeno. En determinados aspectos, el antígeno es un ligando que se une específicamente a un receptor. En estos aspectos, la unión de un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención impide la unión del ligando a su receptor, interrumpiendo la respuesta biológica que resulta de la unión del ligando al receptor. En un aspecto, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la divulgación se une específicamente a B7RP1. Preferiblemente, el fragmento se une específicamente a B7RP1 humana.

15 El término “que se produce de manera natural” o “nativo” tal como se usa en el presente documento y se aplica a un objeto se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado a propósito artificialmente se produce de manera natural. El término “que no se produce de manera natural” o “no nativo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado estructuralmente o se ha sintetizado artificialmente. Por ejemplo, “que no se produce de manera natural” puede referirse a una variante, tal como una variante de polinucleótido que puede producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica, o una variante de polipéptido producida por una variante de polinucleótido de este tipo. Tales variantes incluyen, por ejemplo, las producidas por sustituciones, deleciones o adiciones de nucleótidos que pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes de polinucleótido pueden alterarse en regiones codificantes o no codificantes o ambas. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Especialmente determinadas de éstas son sustituciones, adiciones, deleciones silenciosas y sustituciones conservativas, que no alteran las propiedades y actividades de un anticuerpo frente a B7RP1 de la invención. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente cómo genera una variante de este tipo usando métodos bien conocidos en la técnica.

20 25 El término “operativamente unido” significa que los componentes a los que se aplica el término están en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia de control “operativamente unida” a una secuencia que codifica para proteína está ligada a la misma de modo que se logra la expresión de la secuencia que codifica para proteína en condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias de control.

30 35 El término “secuencia de control” tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótido que pueden efectuar la expresión, el procesamiento o la localización intracelular de secuencias codificantes a las que están operativamente unidas. La naturaleza de tales secuencias de control puede depender del organismo huésped. En aspectos particulares, las secuencias de control para procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción. En otros aspectos particulares, las secuencias de control para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias de poliadenilación. En determinados aspectos, las “secuencias de control” pueden incluir secuencias líder y/o secuencias de parejas de fusión.

40 45 El término “vector” incluye una molécula de ácido nucleico que puede transportar a una célula otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden llevar a cabo una replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped y de ese modo que replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, vectores de expresión útiles en la práctica de técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, la divulgación pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados de replicación defectuosa), que sirven para funciones equivalentes.

50 55 60 La expresión “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”) incluye una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Los expertos en la técnica entenderán que tales términos

pretenden referirse no sólo a la célula sujeto particular sino a la progenie de una célula de este tipo. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a o bien mutación o bien influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula original, pero todavía se incluirá dentro del alcance del término "célula huésped" tal como se usa en el presente documento. Puede usarse una amplia variedad de sistemas de expresión huésped para expresar los anticuerpos de la presente invención incluyendo sistemas de expresión bacterianos, de levadura, de baculovirus y de mamífero (así como sistemas de expresión por presentación en fago). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC19. Para expresar un anticuerpo de manera recombinante, se transfecta una célula huésped con uno o más vectores de expresión recombinante que portan fragmentos de ADN que codifican para las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina del anticuerpo de manera que se expresan las cadenas pesada y ligera en la célula huésped y pueden secretarse al medio en el que se cultivan las células huésped, medio a partir del cual pueden recuperarse los anticuerpos. Se usan metodologías de ADN recombinante convencionales para obtener genes de cadenas pesada y ligera de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante e introducir los vectores en células huésped, tales como las descritas en Sambrook *et al*, 2001, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis *et al*, 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; y Chu *et al*, 1981, Gene 13: 197. Tales técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno dentro de células huésped adecuadas.

El término "transducción" se usa para referirse a la transferencia de genes de una bacteria a otra, habitualmente mediante un fago. "Transducción" también se refiere a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucariotas por retrovirus.

El término "transfección" se usa para referirse a la captación de ADN foráneo o exógeno por una célula, y una célula se ha "transfectado" cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Se conocen bien en la técnica varias técnicas de transfección y se dan a conocer en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Graham *et al*, 1973, Virology 52: 456; Sambrook *et al*, 2001, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis *et al*, 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; y Chu *et al*, 1981, Gene 13: 197. Tales técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno dentro de células huésped adecuadas.

El término "transformación" tal como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente con respecto a su estado nativo. Tras la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con ADN de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, o puede mantenerse de manera transitoria como un elemento episomal sin replicarse, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de manera estable cuando el ADN se replica con la división de la célula.

El término "antígeno" se refiere a una molécula o una parte de una molécula a la que puede unirse un agente de unión selectivo, tal como un anticuerpo, y adicionalmente que puede usarse en un animal para producir anticuerpos que pueden unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítipos.

En determinados aspectos, las variantes de anticuerpo incluyen variantes de glicosilación en las que el número y/o tipo de sitio de glicosilación se ha alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido original. En determinados aspectos, las variantes de proteína comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación unida a N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación unida a N se caracteriza por la secuencia: Asn-Xaa-Ser o Asn-Xaa-Thr, en la que el residuo de aminoácido designado como Xaa puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácido para crear esta secuencia proporciona un posible sitio nuevo para la adición de una cadena de hidrato de carbono unida a N. Alternativamente, sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de hidrato de carbono unida a N existente. También se proporciona una transposición de las cadenas de hidrato de carbono unidas a N en la que se eliminan uno o más sitios de glicosilación unida a N (normalmente los que se producen de manera natural) se crean uno o más sitios unidos a N nuevos. Las variantes de anticuerpo adicionales incluyen variantes de cisteína en las que uno o más residuos de cisteína se delecionan de o se sustituyen por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos original. Variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos deben replegarse para dar una conformación biológicamente activa tal como tras el aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen generalmente menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y normalmente tienen un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas desapareadas.

En aspectos adicionales, las variantes de anticuerpo pueden incluir anticuerpos que comprenden un fragmento Fc modificado o una región constante de cadena pesada modificada. Un fragmento Fc, que significa "fragmento que cristaliza", o una región constante de cadena pesada puede modificarse mediante mutación para conferir al anticuerpo características de unión alteradas. Véanse, por ejemplo, Burton y Woof, 1992, Advances in Immunology 51: 1-84; Ravetch y Bolland, 2001, Annu. Rev. Immunol. 19: 275-90; Shields *et al*, 2001, Journal of Biol. Chem 276: 6591-6604; Telleman y Junghans, 2000, Immunology 100: 245-251; Medesan *et al*, 1998, Eur. J. Immunol. 28: 2092-2100. Tales mutaciones pueden incluir sustituciones, adiciones, delecciones, o cualquier combinación de las mismas, y se producen normalmente mediante mutagénesis dirigida al sitio usando uno o más oligonucleótidos mutagénicos

según los métodos descritos en el presente documento, así como según los métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., 2001, Cold Spring Harbor, N.Y. y Berger y Kimmel, METHODS IN ENZYMOLOGY, volumen 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, CA.).

- 5 Según determinados aspectos, las sustituciones de aminoácidos pueden (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad de unión y/o (4) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en tales polipéptidos. Según determinados aspectos, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (en determinados aspectos, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (en determinados aspectos, en la parte del
- 10 polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares). En determinados aspectos, una sustitución de aminoácido conservativa normalmente no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debe alterar o tender a alterar la estructura secundaria que caracteriza a una secuencia original, tal como una hélice). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptido reconocidas en la técnica en PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR
- 15 PRINCIPLES, (Creighton, Ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, Nueva York; INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE (C. Branden y J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, Nueva York, N.Y.; y Thornton *et al*, 1991, Nature 354:105.

“Anticuerpo” o “péptido(s) de anticuerpo” se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. En determinados aspectos, se producen fragmentos de

20 unión mediante técnicas de ADN recombinante. En aspectos adicionales, se producen fragmentos de unión mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a, F(ab), F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena sencilla.

La divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que las cadenas pesada y ligera forman juntas una estructura de unión a antígeno que puede unirse específicamente a

25 B7RP1. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_H, y tres dominios de región constante, C_H1, C_H2 y C_H3. El dominio V_H está en el extremo amino-terminal del polipéptido, y el dominio C_H3 está en el extremo carboxilo-terminal. El término “cadena pesada”, tal como se usa en el presente documento, engloba una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de la misma. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_L, y un dominio de región constante, C_L. Como la cadena pesada,

30 el dominio de región variable de la cadena ligera está en el extremo amino-terminal del polipéptido. El término “cadena ligera”, tal como se usa en el presente documento, engloba una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma. Un fragmento F(ab) está compuesto por una cadena ligera y el C_H1 y las regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento F(ab') contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene

35 más de la región constante, entre los dominios C_H1 y C_H2, de manera que puede formarse un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂. La región de Fv comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes. Anticuerpos de cadena sencilla son moléculas Fv en las que las regiones variables de cadena pesada y ligera se han conectado mediante un ligador flexible para formar una única cadena de polipéptido, que forma una región de unión a antígeno.

40 Se comentan en detalle anticuerpos de cadena sencilla en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 88/01649 y las patentes estadounidenses n.ºs 4.946.778 y 5.260.203.

Un anticuerpo bivalente distinto de un anticuerpo “multiespecífico” o “multifuncional”, en determinados aspectos, se entiende que comprende sitios de unión que tienen una especificidad antigénica idéntica.

45 En la evaluación de la unión y especificidad del anticuerpo según la divulgación, un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un ligando a un receptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de ligando unido a un receptor en al menos aproximadamente el 20%, el 40%, el 60%, el 80%, el 85%, o más (tal como se mide, entre otros, usando un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

Por “anticuerpo neutralizante” quiere decirse una molécula de anticuerpo que puede bloquear o reducir sustancialmente una función efectora de un antígeno diana al que se une. Por consiguiente, un anticuerpo anti-

50 B7RP1 “neutralizante” puede bloquear o reducir sustancialmente una función efectora, tal como unión al receptor y/o provocación de una respuesta celular, de B7RP1. “Reducir sustancialmente” pretende significar una reducción de al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, o al menos aproximadamente el 90% de una función efectora del antígeno diana (por ejemplo, B7RP1 humana).

55 El término “epítipo” incluye cualquier sitio en un antígeno que puede unirse específicamente a un receptor de células T o inmunoglobulina. En determinados aspectos, los determinantes de epítipo incluyen agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo, y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo. En

60 determinados aspectos, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce

preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En determinados aspectos, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación en equilibrio es de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o menos de aproximadamente 10^{-12} M.

- 5 Un anticuerpo se une “esencialmente al mismo epítipo” que un anticuerpo de referencia, cuando los dos anticuerpos reconocen epítopos idénticos y estéricamente solapantes. Los métodos más ampliamente usados y rápidos para determinar si dos anticuerpos se unen a epítopos idénticos o estéricamente solapantes son ensayos de competición, que pueden configurarse en todos de varios formatos diferentes, usando o bien antígeno marcado o bien anticuerpo marcado. Habitualmente, el antígeno se inmoviliza sobre un sustrato, y se mide la capacidad de los anticuerpos no
10 marcados para bloquear la unión de anticuerpos marcados usando isótopos radiactivos o marcadores enzimáticos.

El término “agente” se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

- Tal como se usa en el presente documento, los términos “marcador” o “marcado” se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido
15 de restos de biotina que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que comprende un marcador detectable tal como un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente o una actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o colorimétricos). En determinados aspectos, el marcador también puede ser terapéutico. Se conocen en la técnica diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas y pueden usarse ventajosamente en los métodos dados a conocer en el presente documento. Los
20 ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos o radionúclidos tales como ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{125}I y ^{131}I , marcadores fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína o FITC, rodamina o fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa del rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, marcadores de hapteno tales como grupos biotinilo, y epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo,
25 secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal o etiquetas de epítipo). En determinados aspectos, los marcadores se unen por brazos espaciadores (tales como $(\text{CH}_2)_n$, en donde $n < \text{aproximadamente } 20$) de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

- El término “muestra biológica”, tal como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, cualquier
30 cantidad de una sustancia de una entidad viva o anteriormente viva. Tales entidades vivas incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, ganglios linfáticos y piel.

- El término “fármaco o agente farmacéutico” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto
35 químico o composición que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente. La expresión “cantidad farmacéuticamente eficaz” en referencia a una composición farmacéutica que comprende uno o una pluralidad de los anticuerpos de la divulgación se entiende que significa, según la divulgación, una cantidad de dicha composición farmacéutica que puede suprimir, en un paciente, la disminución en el umbral de sensibilidad a estímulos externos con una vuelta de este umbral de sensibilidad a un nivel comparable al observado en sujetos sanos.

- Un “trastorno” es cualquier estado que se beneficiaría del tratamiento según la presente invención. “Trastorno” y
40 “estado” se usan indistintamente en el presente documento e incluyen trastornos crónicos y agudos del sistema inmunitario o enfermedades del sistema inmunitario asociadas con una respuesta inmunitaria inapropiada, incluyendo los estados patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Se describen varios estados y trastornos que se beneficiarían del tratamiento según la presente invención, por ejemplo, en la solicitud de
45 patente internacional n.º PCT/US00/01871 (n.º de publicación WO 00/46240).

- Los términos “enfermedad del sistema inmunitario” y “estado del sistema inmunitario” engloban cualquier estado o
trastorno médico asociado con niveles aumentados de B7RP1, sensibilidad aumentada a B7RP1 o enfermedades
50 mediadas por células T, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad autoinmunitaria, supervivencia de injerto, trasplante de órganos y médula ósea, aloinsensibilización debida a transfusiones de sangre, síndrome de choque tóxico, enfermedades mediadas por células B dependientes de células T, enfermedades inflamatorias crónicas asociadas con disfunción crónica de células inmunitarias, trastornos linfoproliferativos (tales como mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y crioglobulinemias), y cáncer. Los ejemplos no limitativos de enfermedades autoinmunitarias incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP), esclerosis múltiple, diabetes y psoriasis. Los ejemplos no limitativos de enfermedades inflamatorias crónicas
55 incluyen enfermedad inflamatoria del intestino (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto y diabetes mellitus.

Los términos “enfermedad del sistema inmunitario” y “estado del sistema inmunitario” también engloban cualquier estado clínico que pueda mejorarse mediante la inhibición de la producción de anticuerpos, tal como reacciones de hipersensibilidad. Las reacciones de hipersensibilidad pueden estar provocadas, por ejemplo, por rinitis polínica,

alergias, asma, atopia y edema agudo. Los ejemplos no limitativos de enfermedades que provocan reacciones de hipersensibilidad mediadas por anticuerpos incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis (tal como artritis reumatoide, artritis reactiva, artritis psoriásica), nefropatías (tales como glomerulonefritis, nefropatías membranosa, mesangiocapilar, segmental focal, necrotizante focal, crescénica y proliferativa tales como tubulopatías), trastornos de la piel (tales como pénfigo y penfigoide, eritema nudoso), endocrinopatías (tales como tiroiditis, enfermedad de Grave, enfermedad de Hashimoto, diabetes mellitus insulino dependiente), diversas pneumopatías (tal como alveolitis extrínseca), diversas vasculopatías, enfermedad celíaca, enfermedades con producción aberrante de IgA, muchas anemias y trombocitopenias, síndrome de Guillain-Barre, y miastenia grave.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” cuando se usan con referencia a un vehículo o una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana se refieren a una cantidad o dosificación suficiente para producir un resultado deseado (es decir, cuando para la terapia con el vehículo o anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana de la presente invención el resultado deseado es la modulación deseada de las respuestas de células T, por ejemplo) o para apoyar una disminución observable en el nivel de una o más actividades biológicas de B7RP1. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad del/de los anticuerpo(s) humano(s) anti-B7RP1 humana suficiente para inhibir, durante algún periodo de tiempo, uno o más de los procesos patológicos definidos clínicamente asociados con el estado en cuestión, por ejemplo trastornos y enfermedades inmunitarios, en un sujeto tratado *in vivo* con el agente. En la presente divulgación, una “cantidad eficaz” de un anticuerpo anti-B7RP1 puede modular respuestas de células T en un paciente. En los métodos de la presente divulgación, el término “control” y variantes gramaticales del mismo se usan para referirse a la prevención, inhibición parcial o completa, reducción, retraso o ralentización de un acontecimiento no deseado, por ejemplo una respuesta inmunitaria. La cantidad eficaz puede variar dependiendo del vehículo o del/ de los anticuerpo(s) humano(s) anti-B7RP1 humana seleccionado(s) específico(s), y también depende de una variedad de factores y estados relacionados con el sujeto que va a tratarse y la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si el vehículo o el/los anticuerpo(s) humano(s) anti-B7RP1 humana va(n) a administrarse *in vivo*, factores tales como la edad, el peso y la salud del paciente así como las curvas de dosis-respuesta y los datos de toxicidad obtenidos en el trabajo preclínico en animales estarían entre los considerados. Si el agente va a ponerse en contacto con las células *in vitro*, también se diseñaría una variedad de estudios preclínicos *in vitro* para evaluar parámetros tales como captación, semivida, dosis, toxicidad, etc. La determinación de una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz para un agente dado está muy dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “proteína 1 relacionada con B7” y “B7RP1” se definen como todas las especies de mamífero de B7RP1 de secuencia nativa, que se describen en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 00/46240.

Tal como se usan en el presente documento, “sustancialmente puro” o “sustancialmente purificado” significa un compuesto o especie que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En determinados aspectos, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En determinados aspectos, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En determinados aspectos, la especie se purifica hasta homogeneidad esencial (no pueden detectarse especies contaminantes en la composición por métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y animales.

“Tratamiento” o “tratar” se refiere a tratamiento tanto terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que el trastorno ha de prevenirse.

A menos que se requiera otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

Según determinados aspectos de la divulgación, pueden usarse anticuerpos dirigidos a B7RP1 para tratar trastornos del sistema inmunitario y enfermedades del sistema inmunitario, incluyendo pero sin limitarse a los mencionados anteriormente.

En un aspecto de la divulgación se proporcionan anticuerpos monoclonales completamente humanos generados contra y que tienen especificidad biológica e inmunológica para la unión a B7RP1 humana. En otro aspecto la divulgación proporciona ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para secuencias de aminoácidos para moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera, particularmente secuencias correspondientes a las regiones variables de las mismas. Aspectos particulares de este aspecto de la divulgación son secuencias correspondientes a regiones determinantes de complementariedad (CDR), específicamente de CDR1 a CDR3, de las cadenas pesada y ligera proporcionadas por la divulgación. Aún en otro aspecto la divulgación proporciona células de hibridoma y líneas celulares que expresan las moléculas de inmunoglobulina y

los anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales de la divulgación. La divulgación también proporciona preparaciones de anticuerpos biológica e inmunológicamente purificadas, tales como anticuerpos monoclonales generados contra y que tienen especificidad biológica e inmunológica para la unión a B7RP1 humana.

5 La capacidad para clonar y reconstruir locus humanos con tamaños de megabases en cromosomas artificiales de levaduras (YAC) e introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un enfoque ventajoso para esclarecer los componentes funcionales de locus muy grandes o mapeados de manera aproximada así como para generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de tal tecnología para la sustitución de locus de ratón por sus equivalentes humanos proporciona una comprensión única de la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas, y su implicación en la inducción y
10 progresión de la enfermedad.

Una importante aplicación práctica de una estrategia de este tipo es la "humanización" del sistema inmunitario humoral del ratón. La introducción de locus de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que los genes de Ig endógenos se han inactivado ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que subyacen a la expresión programada y el ensamblaje de anticuerpos así como su papel en el desarrollo de células B. Además, una estrategia de este tipo proporciona una fuente para la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos (AcM).
15

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes sustancialmente correspondientes a las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos humanos en mamíferos no humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, roedores, tales como ratones y ratas, y lagomorfos, tales como conejos. En determinados aspectos, se producen anticuerpos humanos en células de hibridoma. En determinados aspectos, se producen anticuerpos humanos de manera recombinante.
20

El término "recombinante" en referencia a un anticuerpo incluye anticuerpos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes. Los ejemplos representativos incluyen anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase por ejemplo, Taylor, *et al*, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295); o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier medio que implique cortar y empalmar secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.
25
30

Los anticuerpos humanos tienen al menos tres ventajas con respecto a los anticuerpos no humanos y quiméricos para su uso en terapia en seres humanos:

1) debido a que la parte efectora del anticuerpo es humana, puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano (por ejemplo, destruir las células diana más eficazmente por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC));
35

2) el sistema inmunitario humano no debe reconocer el anticuerpo humano como foráneo y, por tanto, la respuesta de anticuerpos contra un anticuerpo inyectado de este tipo debería ser menor que contra un anticuerpo no humano totalmente foráneo o un anticuerpo quimérico parcialmente foráneo;

3) se ha notificado que los anticuerpos no humanos inyectados tienen una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos inyectados tendrán una semivida esencialmente idéntica a anticuerpos humanos que se producen de manera natural, permitiendo que se administren dosis más pequeñas y menos frecuentes.
40

Por tanto, se espera que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a AcM de ratón o derivatizados de ratón, y de ese modo aumenten la eficacia y seguridad de los anticuerpos administrados. Los anticuerpos completamente humanos de la divulgación, por tanto, pueden usarse en el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con una respuesta inmunitaria inapropiada, requiriendo el tratamiento de la misma la administración repetida de anticuerpos. Por tanto, una ventaja particular de los anticuerpos anti-B7RP1 de la divulgación es que los anticuerpos son completamente humanos y pueden administrarse a pacientes de una manera no aguda al tiempo que se minimizan las reacciones adversas comúnmente asociadas con anticuerpos humanos anti-ratón u otros anticuerpos no completamente humanos descritos anteriormente de especies no humanas.
45
50

Un experto en la técnica puede diseñar por ingeniería genética cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con fragmentos grandes de los locus de Ig humanos de modo que tales ratones producen anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Fragmentos de Ig humana grandes pueden conservar la gran diversidad de genes variables así como la regulación apropiada de la producción y expresión de anticuerpos. Aprovechando la maquinaria celular de ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón produce anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Usando la
55

tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse AcM humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada.

5 También pueden usarse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) para producir anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, la transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno (véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555; Jakobovits *et al*, 1993, Nature 362:255-258; Bruggemann *et al*, 1993, Year in Immun. 7:33, 1994, Nature 148:1547-1553) y, 1996, Nature Biotechnology 14:826; Gross *et al*, 2000, Nature 404:995-999; y las patentes estadounidenses n.ºs 5.877.397, 5.874.299, 5.814.318, 5.789.650, 5.770.429, 10 5.661.016, 5.633.425, 5.625.126, 5.569.825 y 5.545.806). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom y Winter, 1992, J. Mol. Biol. 227:381; Marks *et al*, 1991, J. Mol. Biol. 222:581). Las técnicas de Cole *et al*. y Boerner *et al* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al*, 1985, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY Alan R. Liss, p. 77; y Boerner *et al*, 1991, J. Immunol. 147:86-95).

15 También pueden someterse anticuerpos humanos recombinantes a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de las relacionadas con las secuencias V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

20 En determinados aspectos, el experto en la técnica puede usar regiones constantes de especies distintas de ser humano junto con la(s) región/regiones variable(s) humana(s) en tales ratones para producir anticuerpos quiméricos.

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es normalmente un anticuerpo híbrido artificial que tiene pares de cadena pesada/cadena ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante una variedad de métodos incluyendo, pero sin limitarse a, fusión de hibridomas o unión de fragmentos F(ab'). Véanse, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, 1990, Clin. Exp Immunol. 79: 315-321; Kostelny *et al*, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

25

La divulgación proporciona anticuerpos que se unen a B7RP1 humana. Estos anticuerpos pueden producirse mediante inmunización con B7RP1 de longitud completa o fragmentos de la misma. Los anticuerpos de la divulgación pueden ser policlonales o monoclonales, y/o pueden ser anticuerpos recombinantes. En aspectos preferidos, los anticuerpos de la divulgación son anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, mediante inmunización de animales transgénicos que pueden producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional WO 93/12227).

30

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpos anti-B7RP1 de la invención pueden injertarse en regiones de marco (FR) de la misma u otra especie. En determinados aspectos, las CDR de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo anti-B7RP1 pueden injertarse en FR humanas consenso. Para crear FR humanas consenso, se alinean FR de varias secuencias de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera humanas para identificar una secuencia de aminoácidos consenso. Las FR de la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo anti-B7RP1 pueden sustituirse por las FR de una cadena pesada o cadena ligera diferente. Los aminoácidos poco comunes en las FR de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo anti-B7RP1 normalmente no se sustituyen, mientras que el resto de los aminoácidos de FR pueden sustituirse. Aminoácidos poco comunes son aminoácidos específicos que están en posiciones en las que no se encuentran habitualmente en las FR. Las regiones variables injertadas de los anticuerpos anti-B7RP1 de la invención pueden usarse con una región constante que es diferente de la región constante de anticuerpo anti-B7RP1. Alternativamente, las regiones variables injertadas son parte de un anticuerpo Fv de cadena sencilla. Se describe el injerto de CDR, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089 y 5.530.101.

35

40

45

Pueden prepararse anticuerpos de la divulgación usando ratones transgénicos que tienen una parte sustancial del locus que produce anticuerpos humanos insertado en células que producen anticuerpos de los ratones, y que se modifican por ingeniería genética adicionalmente para que sean deficientes en la producción de anticuerpos endógenos, murinos. Tales ratones pueden producir moléculas de inmunoglobulina humana y anticuerpos y no producen o producen cantidades sustancialmente reducidas de anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina murinos. Las tecnologías utilizadas para lograr este resultado se dan a conocer en las patentes, solicitudes y referencias dadas a conocer en la memoria descriptiva en el presente documento. En determinados aspectos, el experto puede emplear métodos tal como se dan a conocer en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 98/24893. Véase también Mendez *et al*, 1997, Nature Genetics 15:146-156.

50

55

Los anticuerpos monoclonales (AcM) de la divulgación pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluyendo metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein (1975, Nature 256:495). Pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Un sistema animal a modo de ejemplo para preparar hibridomas es el ratón. Se conocen en la técnica la producción de hibridomas en el ratón y también se conocen en la técnica protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. También se conocen parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murinas) y procedimientos de fusión.

5 En un determinado aspecto, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra B7RP1 usando ratones transgénicos que portan partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos, denominados en el presente documento ratones "HuMab", contienen un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica para secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y pesada humana (μ y γ) sometidas a retransposición, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus de cadena μ y κ endógenos (Lonberg *et al*, 1994, Nature 368:856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de κ o IgM de ratón y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y cadena ligera humana introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales de IgG κ humanos de alta afinidad (Lonberg *et al*, citado anteriormente.; Lonberg y Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 12:65-93; Harding y Lonberg, 1995, Ann.N.Y.Acad.Sci. 764:536-546). La preparación de ratones HuMab se describe en detalle en Taylor *et al*, 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295; Chen *et al*, 1993, International Immunology 5:647-656; Tuailon *et al*, 1994, J. Immunol 152:2912-2920; Lonberg *et al*, 1994, Nature 368:856-859; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Taylor *et al*, 1994, International Immunology 6:579-591; Lonberg y Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol 13:65-93; Harding y Lonberg, 1995, Ann. NY. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild *et al*, 1996, Nature Biotechnology 14:845-851. Véanse adicionalmente las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas concedidas a Lonberg y Kay, así como la patente estadounidense n.º 5.545.807 concedida a Surani *et al*; las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; WO 92/22646, publicada el 23 de diciembre de 1992; y WO 92/03918, publicada el 19 de marzo de 1992. Alternativamente, pueden usarse cepas de ratones transgénicos descritas en los ejemplos a continuación para generar anticuerpos humanos anti-B7RP1.

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales humanos que son específicos para y neutralizan polipéptidos de B7RP1 humana bioactivos. También se proporcionan secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera de anticuerpos que son altamente específicas y neutralizan polipéptidos de B7RP1 cuando se unen a los mismos. Esta alta especificidad permite que los anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana, y anticuerpos monoclonales humanos con especificidad similar, sean una inmunoterapia eficaz para enfermedades asociadas a B7RP1.

En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos humanos aislados que se unen al mismo o esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo 16H proporcionado en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos humanos aislados que comprenden al menos una de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 1-40 o 44-58 que se unen a un epítipo de polipéptido de B7RP1 con alta afinidad y tienen la capacidad de antagonizar la actividad de polipéptido de B7RP1. Estos anticuerpos pueden unirse al mismo o esencialmente el mismo epítipo que los anticuerpos anti-B7RP1 mostrados en los ejemplos en el presente documento.

En determinados aspectos, los anticuerpos aislados se unen a polipéptido de B7RP1 con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o menos e inhiben la supervivencia inducida por B7RP1 en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CE_{50} de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M o menos. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana que cumplen los criterios de unión y neutralización mencionados anteriormente.

En determinados aspectos, los anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana de la invención se denominan en el presente documento 16H, 16Hg (línea germinal), 5D, 2H, 2Hg (línea germinal), 15H, 41H y 43H. El anticuerpo 16H comprende secuencias de polipéptido V_L y V_H tal como se muestra en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 1, respectivamente. El anticuerpo 16Hg comprende secuencias de polipéptido de cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 8, respectivamente. El anticuerpo 5D comprende secuencias de polipéptido V_L y V_H tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 9, respectivamente. El anticuerpo 2H comprende secuencias de polipéptido V_L y V_H tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 10, respectivamente. El anticuerpo 2Hg comprende secuencias de polipéptido V_L y V_H tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 11, respectivamente. El anticuerpo 15H comprende secuencias de polipéptido V_L y V_H tal como se muestra en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 12, respectivamente. El anticuerpo 41H comprende secuencias de polipéptido V_L y V_H tal como se muestra en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 13, respectivamente. El anticuerpo 43H comprende secuencias de polipéptido V_L y V_H tal como se muestra en SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 14, respectivamente. Las propiedades de los anticuerpos humanos anti-B7RP1 humana de la presente divulgación se dan a conocer específicamente en los ejemplos. Particularmente notable es la alta afinidad por el polipéptido de B7RP1 y la alta capacidad de antagonizar la actividad del polipéptido de B7RP1 demostradas en el presente documento.

La constante de disociación (K_D) de un anticuerpo humano anti-B7RP1 humana puede determinarse mediante

resonancia de plasmón superficial tal como se describe generalmente en los ejemplos a continuación. Generalmente, el análisis de resonancia de plasmón superficial mide interacciones de unión en tiempo real entre ligando (polipéptido de B7RP1 recombinante inmovilizado sobre una matriz de biosensor) y analito (anticuerpos en disolución) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando el sistema BIAcore® (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). El análisis de plasmón superficial también puede realizarse inmovilizando el analito (anticuerpos sobre una matriz de biosensor) y presentando el ligando (V recombinante en disolución). La constante de disociación (K_D) de un anticuerpo humano anti-B7RP1 humana también puede determinarse usando la metodología KinExA. En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos se unen a B7RP1 con una K_D de aproximadamente 10^5 M, 10^6 M, 10^7 M, 10^8 M, 10^9 M, 10^{10} M, 10^{11} M o 10^{12} M. El término " K_D ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Para los fines de la presente divulgación K_D se determinó tal como se muestra en los ejemplos más adelante.

En determinados aspectos, los anticuerpos de la divulgación son del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos pueden ser del isotipo IgG2 o IgG1. En otros aspectos, los anticuerpos de la divulgación pueden ser del isotipo IgM, IgA, IgE o IgD. En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. La expresión de los anticuerpos de la divulgación que comprenden una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG2 se describe en los ejemplos más adelante. En aspectos particulares, las regiones variables de los anticuerpos se ligan a una región constante distinta de la región constante para el isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En determinados aspectos, los anticuerpos de la divulgación se han clonado para su expresión en células de mamífero.

En determinados aspectos, modificaciones conservativas en las cadenas pesadas y cadenas ligeras de anticuerpos anti-B7RP1 (y modificaciones correspondientes en los nucleótidos codificantes) producirán anticuerpos anti-B7RP1 que tienen características químicas y funcionales similares a las de los anticuerpos anti-B7RP1 dados a conocer en el presente documento. En cambio, pueden lograrse modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de anticuerpos anti-B7RP1 seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto molecular en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácido conservativa" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo con un residuo no nativo de manera que hay poco o ningún efecto sobre la polaridad o la carga del residuo de aminoácido en esa posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido puede sustituirse también con alanina, tal como se ha descrito anteriormente para "mutagénesis por exploración de alanina".

Los expertos en la técnica pueden determinar sustituciones de aminoácidos (ya sean conservativas o no conservativas) en el momento en el que se deseen tales sustituciones. En determinados aspectos, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para identificar aquellos residuos de aminoácido de un anticuerpo anti-B7RP1 que están implicados en la especificidad y/o afinidad de unión del anticuerpo para B7RP1 (por ejemplo residuos que están implicados en la unión del anticuerpo a un epítipo particular), tales como residuos de aminoácido en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de las cadenas pesada o ligera tal como se describe en el presente documento. Tales sustituciones de aminoácidos pueden aumentar o disminuir la afinidad de los anticuerpos anti-B7RP1 descritos en el presente documento.

Cambios menores en una secuencia de aminoácidos tal como delección, adición o sustitución de uno, unos cuantos o incluso varios aminoácidos pueden conducir a una forma alélica de la proteína original que tiene propiedades sustancialmente idénticas. Por tanto, además de los anticuerpos descritos específicamente en el presente documento, otros anticuerpos "sustancialmente homólogos" pueden diseñarse y fabricarse fácilmente utilizando diversas técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la técnica. En general, pueden lograrse fácilmente modificaciones de los genes mediante una variedad de técnicas bien conocidas, tales como mutagénesis dirigida al sitio. Por tanto, la presente divulgación contempla anticuerpos humanos anti-B7RP1 "variantes" o "mutantes" que tienen características sustancialmente similares a los anticuerpos humanos anti-B7RP1 dados a conocer en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento WO 00/56772). Por tanto, mediante el término "variante" o "mutante" en referencia a un anticuerpo humano anti-B7RP1 quiere decirse cualquier molécula de unión (molécula X) (i) en la que las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada o las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera tomadas en su totalidad son al menos aproximadamente el 80% homólogas, al menos aproximadamente el 90% homólogas o al menos aproximadamente el 95% homólogas a las regiones hipervariables mostradas en SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO: 40, respectivamente, y (ii) en la que la variante o el mutante puede inhibir la actividad de B7RP1 humana en el mismo grado que un anticuerpo humano anti-B7RP1 de referencia que tiene regiones de marco idénticas a las de la molécula X. Tales anticuerpos pueden unirse a B7RP1 humana o a B7RP1 de ratón o ambas. La secuencia de B7RP1 de ratón se describe en el documento WO 00/46240.

Habitualmente, una variante de anticuerpo humano anti-B7RP1 tendrá CDR de cadena ligera y/o pesada, cuando se toman en su totalidad, que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 85%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 91%, identidad de secuencia de

al menos aproximadamente el 92%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 93%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 94%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 95%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 96%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 97%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 98%, o identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO. 26 y/o SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO. 40, respectivamente. Tales anticuerpos pueden unirse a B7RP1 humana o a B7RP1 de ratón o a ambas.

Una variante de anticuerpo humano anti-B7RP1 tendrá una región variable de cadena ligera, cuando se toma en su totalidad, que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 81%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 82%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 83%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 85%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 86%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 87%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 88%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 89%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 91%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 92%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 93%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 94%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 95%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 96%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 97%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 98%, identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO. 6, y/o una región variable de cadena pesada, cuando se toma en su totalidad, que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 70%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 80%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 81%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 82%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 83%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 85%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 86%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 87%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 88%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 89%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 91%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 92%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 93%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 94%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 95%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 96%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 97%, identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 98%, o identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO. 14. Tales anticuerpos pueden unirse a B7RP1 humana y/o B7RP1 de ratón.

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, muchos de los posibles residuos de contacto con CDR son propensos a sustitución por otros aminoácidos y permiten todavía que el anticuerpo conserve una afinidad sustancial por el antígeno. Asimismo, muchos de los residuos de marco que no están en contacto con las CDR en las cadenas pesada y ligera pueden admitir sustituciones de aminoácidos de las posiciones correspondientes de otros anticuerpos humanos, por aminoácidos consenso humanos, o de otros anticuerpos de ratón, sin pérdida significativa de la afinidad o no inmunogenicidad del anticuerpo humano. La selección de diversos aminoácidos alternativos puede usarse para producir versiones de los anticuerpos anti-B7RP1 dados a conocer y fragmentos de los mismos que tienen combinaciones variables de afinidad, especificidad, no inmunogenicidad, facilidad de fabricación y otras propiedades deseables.

Una "variante" en referencia a un polinucleótido pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 75% con una secuencia de polinucleótido de la presente invención. Habitualmente, una variante de polinucleótido tendrá una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 75%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 80%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 81%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 82%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 83%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 84%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 85%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 86%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 87%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 88%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 89%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 90%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 91%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 92%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 93%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 94%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 95%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 96%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 97%, identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 98%, o identidad de secuencia de ácido

nucleico de al menos aproximadamente el 99% con una secuencia novedosa de ácido nucleico dada a conocer en el presente documento.

En aspectos alternativos, los anticuerpos de la divulgación pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. En estos aspectos, pueden usarse secuencias que codifican para anticuerpos particulares para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada. Según estos aspectos, la transformación puede lograrse usando cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transduciendo una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, tal como se ejemplifica mediante las patentes estadounidenses n.^{os} 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. Generalmente, el procedimiento de transformación usado puede depender del huésped que va a transformarse. Se conocen bien en la técnica métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Una molécula de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada, una región variable de cadena pesada, una región constante de cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-B7RP1 de la invención se inserta en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligamiento convencionales. En un aspecto, la región constante de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo anti-B7RP1 se añade al extremo C-terminal de la región variable apropiada y se liga en un vector de expresión. El vector se selecciona normalmente para que sea funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de manera que puede producirse la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Para una revisión de vectores de expresión, véase METHODS IN ENZYMOLOGY 185 (Goeddel, ed.), 1990, Academic Press.

Normalmente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Tales secuencias, denominadas colectivamente "secuencias flanqueantes" en determinados aspectos incluirán normalmente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio donador y aceptor de corte y empalme, una secuencia que codifica para una secuencia líder para la secreción del polipéptido, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de poliligador para insertar el ácido nucleico que codifica para el polipéptido que va a expresarse y un elemento de marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se comenta a continuación.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica para una "etiqueta", es decir, una molécula de oligonucleótido ubicada en el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica para el polipéptido de anticuerpo anti-B7RP1; la secuencia de oligonucleótido codifica para poliHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (hemaglutinina de virus influenza), o myc para las que existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta se fusiona normalmente al polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para la purificación por afinidad o detección del anticuerpo anti-B7RP1 de la célula huésped. La purificación por afinidad puede lograrse, por ejemplo, mediante cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede retirarse posteriormente del polipéptido de anticuerpo anti-B7RP1 purificado por diversos medios tales como usando determinadas peptidasas para la escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de célula huésped), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticas o nativas. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional en, y pueda activarse por, la maquinaria de la célula huésped.

Pueden obtenerse secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta divulgación mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica. Normalmente, las secuencias flanqueantes útiles en el presente documento se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o mediante digestión con endonucleasas de restricción y por tanto pueden aislarse de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante. En este caso, la secuencia flanqueante puede sintetizarse usando los métodos descritos en el presente documento para la clonación y síntesis de ácido nucleico.

Ya se conozca toda o sólo una parte de la secuencia flanqueante, puede obtenerse usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o examinando una biblioteca genómica con una sonda adecuada tal como un oligonucleótido y/o fragmento de secuencia flanqueante de la misma u otra especie. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante de un trozo más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro(s) gen o genes. El aislamiento puede lograrse mediante digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado seguido por

aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA) u otros métodos conocidos por el experto en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para lograr este fin será fácilmente evidente para un experto habitual en la técnica.

5 Un origen de replicación es normalmente una parte de estos vectores de expresión procariotas adquirida comercialmente, y el origen ayuda en la amplificación del vector en una célula huésped. Si el vector de elección no contiene un sitio de origen de replicación, puede sintetizarse químicamente basándose en una secuencia conocida, y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, y diversos orígenes virales (por ejemplo, SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), o papilomavirus tales como VPH o VPB) son útiles para
10 clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen de SV40 se usa a menudo sólo porque también contiene el promotor temprano del virus).

Una secuencia de terminación de la transcripción se ubica normalmente en 3' con respecto al extremo de una región que codifica para polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia de poli-T. Aunque la secuencia se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando métodos para la síntesis de ácido nucleico tales como los descritos en el presente documento.

20 Un gen de marcador seleccionable codifica para una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped hecha crecer en un medio de cultivo selectivo. Genes de marcadores de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células huésped procariotas; (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos o definidos. Marcadores seleccionables a modo de ejemplo son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. Ventajosamente, también puede usarse un gen de resistencia a neomicina para la selección en células huésped tanto procariotas como eucariotas.

Pueden usarse otros genes seleccionables para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el proceso en el que se repiten en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes los genes que se requieren para la producción de una proteína crítica para el crecimiento o la supervivencia celular. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y genes de timidina cinasa sin promotor. Se colocan transformantes de células de mamífero bajo presión de selección en la que sólo los transformantes se adaptan excepcionalmente a la supervivencia en virtud del gen seleccionable presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración de agente de selección en el medio se aumenta sucesivamente, conduciendo de ese modo a la amplificación de tanto el gen seleccionable como el ADN que codifica para otro gen, tal como un anticuerpo que se une al polipéptido de B7RP1. Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas de un polipéptido tal como un anticuerpo anti-B7RP1 a partir del ADN amplificado.

Habitualmente es necesario un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento se ubica normalmente en 3' con respecto al promotor y en 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido que va a expresarse.

45 En algunos casos, tales como cuando se desea glicosilación en un sistema de expresión de células huésped eucariotas, pueden manipularse las diversas pre- o prosecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, puede alterarse el sitio de escisión de peptidasas de un péptido señal particular, o añadirse prosecuencias, que también pueden afectar a la glicosilación. El producto de proteína final puede tener, en la posición -1 (en relación con el primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales conducentes a expresión, que pueden no haberse eliminado totalmente. Por ejemplo, el producto de proteína final puede tener uno o dos residuos de aminoácido que se encuentran en el sitio de escisión de peptidasas, unidos al extremo amino-terminal. Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en una zona de este tipo dentro del polipéptido maduro.

Los vectores de expresión y clonación de la divulgación contendrán normalmente un promotor que se reconoce por el organismo huésped y está operativamente unido a la molécula que codifica para el anticuerpo anti-B7RP1. Los promotores son secuencias no transcritas ubicadas en el sentido de 5' (es decir, en 5') con respecto al codón de iniciación de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles aumentados de transcripción a partir del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por otro lado, transcriben de manera uniforme los genes a los que están operativamente unidos, es decir, con poco o ningún control sobre la
60

expresión génica. Se conocen bien un gran número de promotores, reconocidos por una variedad de posibles células huésped. Un promotor adecuado está operativamente unido al ADN que codifica para la cadena pesada o cadena ligera que comprende un anticuerpo anti-B7RP1 de la invención retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia de promotor deseada en el vector.

- 5 Se conocen bien en la técnica promotores adecuados para su uso con huéspedes de levadura. Se usan ventajosamente potenciadores de levadura con promotores de levadura. Se conocen bien promotores adecuados para su uso con células huésped de mamífero e incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40). Otros
10 promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, pero no se limitan a: promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); promotor de CMV (Thomsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:659-663); el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); el promotor de timidina cinasa de herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); secuencias reguladoras y de promotor del gen de metalotioneína (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); y promotores procariontes tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); o el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25).
15 También son de interés las siguientes regiones de control de la transcripción animales, que presentan especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-22); la región de control de genes de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-44); la región de control del virus de tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); la región de control del gen de albúmina que es activa en hígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel* 1:268-76); la región de control del gen de alfa-feto-proteína que es activa en hígado (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol Cell. Biol.* 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); la región de control del gen de alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel* 1:161-71); la región de control del gen de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); la región de control del gen de proteína básica de la mielina que es activa en células de oligodendrocitos en el cerebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); la región de control del gen de cadena ligera 2 de miosina que es activa en músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); y la región de control del gen de hormona liberadora gonadotrófica que es activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).
20
25
30
35

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción de ADN que codifica para cadena ligera o cadena pesada que comprende un anticuerpo anti-B7RP1 de la invención por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de ADN de actuación en cis, habitualmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente
40 independientes de orientación y posición, habiéndose encontrado en posiciones tanto en 5' como en 3' con respecto a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamífero (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Sin embargo, normalmente se usa un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio y potenciadores de adenovirus conocidos en la técnica son elementos potenciadores a modo de ejemplo para la activación de promotores eucariotas. Aunque un potenciador puede estar situado en el vector o bien en 5' o bien en 3' con respecto a una secuencia codificante, normalmente está ubicado en un sitio en 5' con respecto al promotor.
45

Pueden construirse vectores de expresión de la divulgación a partir de un vector de partida tal como un vector disponible comercialmente. Tales vectores pueden contener o no todas las secuencias flanqueantes deseadas. Cuando una o más de las secuencias flanqueantes descritas en el presente documento no están ya presentes en el vector, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos usados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes.
50

Tras haberse construido el vector y una molécula de ácido nucleico que codifica para una cadena ligera, una cadena pesada o una cadena ligera y una cadena pesada que comprenden un anticuerpo anti-B7RP1 se ha insertado en el sitio apropiado del vector, puede insertarse el vector completo en una célula huésped adecuada para la amplificación y/o la expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un anticuerpo anti-B7RP1 en una célula huésped seleccionada puede lograrse mediante métodos bien conocidos incluyendo transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano, u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped que va a usarse. Estos métodos y otros métodos adecuados los conoce bien el experto en la técnica, y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.
55
60

Una célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, sintetiza un anticuerpo anti-B7RP1 que posteriormente puede recogerse del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta al medio) o directamente de la célula huésped que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de diversos factores, tales como niveles de expresión deseados, modificaciones de polipéptido que son deseables o necesarias para la actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y facilidad de plegamiento para dar una molécula biológicamente activa.

Se conocen bien en la técnica líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión e incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), incluyendo pero sin limitarse a células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y varias de otras líneas celulares. En determinadas realizaciones, las líneas celulares pueden seleccionarse a través de la determinación de qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen de manera constitutiva anticuerpos con propiedades de unión a B7RP1. En otro aspecto, puede seleccionarse una línea celular del linaje de células B que no produce su propio anticuerpo pero que tiene la capacidad de producir y secretar un anticuerpo heterólogo.

Los anticuerpos de la divulgación son útiles para detectar B7RP1 en muestras biológicas y la identificación de células o tejidos que producen proteína B7RP1. Anticuerpos de la divulgación que se unen específicamente a B7RP1 pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por B7RP1. Dichos anticuerpos pueden usarse en ensayos de unión para detectar B7RP1 y para inhibir la formación de un complejo de B7RP1 con receptores de B7RP1. Dichos anticuerpos que se unen a B7RP1 y bloquean la interacción con otros compuestos de unión pueden tener uso terapéutico en la modulación de enfermedades mediadas por B7RP1. En determinados aspectos, anticuerpos frente a B7RP1 pueden bloquear la unión de B7RP1 a su receptor, lo que puede dar como resultado la alteración de la cascada de transducción de señales inducida por B7RP1.

La presente divulgación también se refiere al uso de uno o más de los anticuerpos de la presente divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o estado provocado por expresión aumentada de B7RP1 o sensibilidad aumentada a B7RP1 en un paciente tal como uno cualquiera de los trastornos o estados dados a conocer en el presente documento.

En determinados aspectos, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o una pluralidad de los anticuerpos de la divulgación junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Los materiales de formulación aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. En aspectos preferidos, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-B7RP1.

En determinados aspectos, los materiales de formulación aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

En determinados aspectos, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. En tales aspectos, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tal como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tal como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, saborizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, por ejemplo, cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª edición, (A.R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

En determinados aspectos, la composición farmacéutica óptima la determinará un experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente. En determinados aspectos, tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de

aclareamiento *in vivo* de los anticuerpos de la invención.

- En determinados aspectos, el vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza o bien acuosa o bien no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos a modo de ejemplo adicionales. En determinados aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, y pueden incluir además sorbitol, sacarosa, Tween-20 y/o un sustituto adecuado para los mismos. En determinados aspectos de la divulgación, pueden prepararse composiciones de anticuerpo anti-B7RP1 para su almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (REMYN'TON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, en determinados aspectos, el producto de anticuerpo anti-B7RP1 puede formularse como un producto liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.
- Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden seleccionarse para administración parenteral. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está entro del conocimiento de la técnica.
- Los componentes de formulación se presentan en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinados aspectos, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.
- Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en esta divulgación pueden proporcionarse en forma de una disolución acuosa libre de pirógenos, aceptable por vía parenteral que comprende el anticuerpo anti-B7RP1 deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que el anticuerpo anti-B7RP1 se formula como una disolución estéril, isotónica, apropiadamente conservada. En determinados aspectos, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico)), perlas o liposomas, que pueden proporcionar liberación controlada o sostenida del producto que puede administrarse por medio de inyección de depósito. En determinados aspectos, también puede usarse ácido hialurónico, que tiene el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. En determinados aspectos, pueden usarse dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir la molécula de anticuerpo deseada.
- Pueden formularse composiciones farmacéuticas de la divulgación para inhalación. En estos aspectos, los anticuerpos anti-B7RP1 se formulan ventajosamente como un polvo seco, inhalable. En determinados aspectos, también pueden formularse disolución de inhalación de anticuerpo anti-B7RP1 con un propelente para administración por aerosol. En determinados aspectos, las disoluciones pueden nebulizarse. Se describen adicionalmente por tanto métodos de formulación y administración pulmonar en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US94/001875 que describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas.
- También se contempla que las formulaciones puedan administrarse por vía oral. Los anticuerpos anti-B7RP1 que se administran de este modo pueden formularse con o sin portadores usados habitualmente en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En determinados aspectos, puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del anticuerpo anti-B7RP1. También pueden emplearse diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.
- Se proporciona una composición farmacéutica de la divulgación que comprende una cantidad eficaz de uno o una pluralidad de anticuerpos anti-B7RP1 en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse disoluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.
- Resultarán evidentes composiciones farmacéuticas adicionales a los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican anticuerpos anti-B7RP1 en formulaciones de administración sostenida o controlada. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional n.º PCT/US93/00829 que describe

la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímero semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 3.773.919 y la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al*, 1983, *Biopolymers* 22:547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 y Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), etileno-acetato de vinilo (Langer *et al*, citado anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (publicación de solicitud de patente europea n.º EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, Eppstein *et al*, 1985, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82:3688-3692; publicaciones de solicitud de patente europea n.ºs EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

Las composiciones farmacéuticas usadas para la administración *in vivo* se proporcionan normalmente como preparaciones estériles. La esterilización puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede realizarse o bien antes o bien tras la liofilización y reconstitución. Las composiciones para administración parenteral pueden almacenarse en forma liofilizada o en una disolución. Las composiciones parenterales se colocan generalmente en un recipiente que tiene un punto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que la composición farmacéutica se ha formulado, puede almacenarse en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse o bien en una forma lista para usar o bien en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de su administración.

La divulgación también proporciona kits para producir una unidad de administración de una sola dosis. Los kits de la divulgación pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína secada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En determinados aspectos de esta divulgación, se proporcionan kits que contienen jeringas precargadas de una sola y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contiene anticuerpo anti-B7RP1 que va a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que está usándose el anticuerpo anti-B7RP1, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de órgano) y/o el estado (la edad y salud general) del paciente. En determinados aspectos, el médico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg y hasta aproximadamente 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En determinados aspectos, la dosificación puede oscilar entre 0,1 µg/kg y hasta aproximadamente 30 mg/kg; desde 1 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg; o desde 5 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo anti-B7RP1 particular en la formulación usada. Normalmente, un médico administra la composición hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. La composición puede administrarse por tanto como una dosis individual, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua por medio de un catéter o dispositivo de implantación. Los expertos habituales en la técnica realizan de manera rutinaria un refinamiento adicional de la dosificación apropiada y está dentro del ámbito de las tareas que realizan de manera rutinaria. Pueden determinarse dosificaciones apropiadas a través del uso de datos de dosis-respuesta apropiados. En determinados aspectos, los anticuerpos de la divulgación pueden administrarse a pacientes a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. La administración crónica de un anticuerpo de la invención minimiza la respuesta inmunitaria o alérgica adversa comúnmente asociada con los anticuerpos que se generan contra un antígeno humano en un animal no humano, por ejemplo, un anticuerpo no completamente humano producido en una especie no humana.

La vía de administración de la composición farmacéutica es según métodos conocidos, por ejemplo por vía oral, a través de inyección mediante vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. En determinados aspectos, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.

La composición también puede administrarse localmente por medio de implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha adsorbido o encapsulado la molécula deseada. En determinados aspectos, cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser por medio de difusión, bolo de liberación en

el tiempo o administración continua.

También puede ser deseable usar composiciones farmacéuticas de anticuerpo anti-B7RP1 según la divulgación *ex vivo*. En tales casos, se exponen células, tejido u órganos que se han extirpado del paciente a composiciones farmacéuticas de anticuerpo anti-B7RP1 tras lo cual las células, los tejidos y/o los órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.

En particular, pueden administrarse anticuerpos anti-B7RP1 implantando determinadas células que se han modificado por ingeniería genética usando métodos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar el polipéptido. En determinados aspectos, tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. En determinados aspectos, las células pueden inmortalizarse. En otros aspectos, con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. En aspectos adicionales, los materiales de encapsulación son normalmente membranas o envueltas poliméricas semipermeables, biocompatibles, que permiten la liberación del/de los producto(s) de proteína pero impiden la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados logrados se proporcionan únicamente para fines ilustrativos y no debe interpretarse que limitan la invención.

Ejemplo 1

Producción de anticuerpos monoclonales humanos contra la proteína 1 relacionada con B7 (B7RP1)

Antígeno

Se usaron como antígeno B7RP-1 humana recombinante purificada (hB7RP-1) preparada tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 00/46240, o células CHO transfectadas para expresar hB7RP-1. B7RP-1 humana madura tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos X a 302 en la secuencia mostrada en el documento WO 00/46240 como SEQ ID NO: 17, en la que X puede ser 19, 20, 21, 22, 24 ó 28.

Ratones HuMab transgénicos

Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a B7RP-1 usando las cepas HCo7 y HCo12 de ratones transgénicos HuMab, ambas de las cuales expresan genes de anticuerpos humanos. En ambas de estas cepas de ratón, el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno se ha alterado de manera homocigota tal como se describe en Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen de cadena pesada de ratón endógeno se ha alterado de manera homocigota tal como se describe en el ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, tal como se describe en Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. La cepa HCo7 porta el transgén de cadena pesada humana HCo7 descrito en las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. La cepa HCo12 porta el transgén de cadena pesada humana HCo12 tal como se describe en el ejemplo 2 de la publicación PCT WO 01/09187.

Inmunizaciones de HuMab:

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a B7RP-1, se inmunizaron ratones HuMab de la cepa HCo7 o HCo12 con B7RP-1 recombinante purificada o células CHO transfectadas para expresar B7RP-1. Se describen esquemas de inmunización generales para ratones HuMab en Lonberg *et al.* (1994; Nature 368(6474): 856-859; Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y la publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían 6-16 semanas de edad tras la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación recombinante purificada de antígeno B7RP-1 (50 µg) o una preparación de células CHO transfectadas ($3,5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células) para inmunizar los ratones HuMab de manera intraperitoneal.

Se inmunizaron los ratones transgénicos dos veces con antígeno purificado en adyuvante completo de Freund por vía intraperitoneal, seguido por 2-4 semanas de inmunizaciones por vía i.p. (hasta un total de 8 inmunizaciones) con el antígeno purificado en adyuvante incompleto de Freund. La inmunización con células CHO transfectadas para expresar B7RP-1 era igual excepto porque no se usaron adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund con las células. Se monitorizó la respuesta inmunitaria mediante sangrados retroorbitales. Se examinó el plasma mediante ELISA (tal como se describe a continuación), y se usaron ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-B7RP-1 para las fusiones. Se les administró a los ratones inmunizaciones de refuerzo por vía intravenosa con antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo. Normalmente, se realizaron 10-20 fusiones para cada antígeno. Se inmunizaron varias docenas de ratones para cada antígeno. Se inmunizó un total de 28 ratones de las cepas de ratones HCo7 y HCo12 con B7RP-1.

Selección de ratones HuMab que producen anticuerpos anti-B7RP-1:

Para seleccionar ratones HuMab que producían anticuerpos que se unían a B7RP-1, se sometieron a prueba mediante ELISA sueros de ratones inmunizados tal como se describe por Fishwild *et al.* (1996). En resumen, se recubrieron placas de microtitulación con B7RP-1 recombinante purificada a 1-2 µg /ml en PBS, 50 µl/pocillo, se incubaron a 4°C durante la noche, luego se bloquearon con 200 µl/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0,05%). Se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados con B7RP-1 a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween y luego se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de IgG humana conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar, se revelaron las placas con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron mediante espectrofotómetro a una DO de 415-495. Se usaron para las fusiones los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti-B7RP-1. Se realizaron las fusiones tal como se describe a continuación y se sometieron a prueba los sobrenadantes de hibridoma para detectar actividad anti-B7RP-1 mediante ELISA.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos frente a B7RP-1:

Se fusionaron con PEG los esplenocitos de ratón, aislados de los ratones HuMab, a una línea celular de mieloma de ratón basándose en protocolos convencionales. Entonces se examinaron los hibridomas resultantes para detectar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Se fusionaron suspensiones de una sola célula de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a un cuarto del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con el 50% de PEG (Sigma). Se sembraron en placa las células a aproximadamente 1x10⁵/pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido por aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo que contenía suero bovino fetal al 10%, medio condicionado P388D1 al 10% (ATCC, CRL TIB-63), origen al 3-5% (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alta concentración de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, gentamicina 50 mg/ml y 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Tras 1-2 semanas, se cultivaron las células en medio en el que se sustituyó HAT por HT. Entonces se examinaron pocillos individuales mediante ELISA (descrito anteriormente) para detectar anticuerpos IgG monoclonales anti-B7RP-1. Una vez que se produjo un crecimiento de hibridomas extenso, se monitorizó el medio habitualmente tras 10-14 días. Volvieron a sembrarse en placa los hibridomas que secretaban anticuerpos, se examinaron de nuevo y, si todavía eran positivos para IgG humana, se subclonaron anticuerpos monoclonales anti-B7RP-1 al menos dos veces mediante dilución limitante. Entonces se cultivaron los subclones estables *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización adicional.

Ejemplo 2

Clonación de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-B7RP1

Se usó el hibridoma que expresa el anticuerpo monoclonal 16H que se une a B7RP1 como fuente para aislar ARN total usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen). Se ligó un oligonucleótido de 5' RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) (5'-CGA CUG GAG CAC GAG GAC ACU GAC AUG GAC UGA AGG AGU AGA AA-3'; SEQ ID NO: 69) al ARN usando los componentes y el protocolo del kit GeneRacer™ (Invitrogen). Se sintetizó ADNc de primera hebra usando un cebador al azar con un adaptador de extensión (5'-_GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3') (SEQ ED NO: 59) y se realizó un ensayo preparativo de 5' RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) usando el kit GeneRacer™ (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Para preparar el ADNc que codifica para la cadena ligera completa, el cebador directo fue el cebador anidado GeneRacer™, y el cebador inverso fue (5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3') (SEQ ID NO: 60). Para preparar ADNc que codifica para la región variable de la cadena pesada, el cebador directo fue el cebador anidado GeneRacer™ y el cebador inverso fue (5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3') (SEQ ID NO: 61). Se clonaron los productos de RACE en pCR4-TOPO (Invitrogen) y se determinaron las secuencias. Se usaron las secuencias consenso para diseñar cebadores para la amplificación por PCR de la cadena de anticuerpo de longitud completa.

Para preparar ADNc que codifica para cadena ligera kappa de 16H anti-B7RP1, el cebador de PCR en 5' codificó para el extremo amino-terminal de la secuencia señal, un sitio de enzima de restricción XbaI y una secuencia de Kozak optimizada (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA CAT GAG GGT CCT CGC TCA GCT CCT GGG-3') (SEQ ID NO: 62). El cebador en 3' codificó para el extremo carboxilo-terminal y un codón de terminación, así como un sitio de restricción Sall (5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3') (SEQ ID NO: 63). Se purificó el fragmento de producto de PCR resultante, se digirió con XbaI y Sall, y luego se aisló en gel y se ligó al vector de expresión de mamífero pDSRα20 (véase la publicación de solicitud internacional n.º WO 90/14363). Se produjo pDSRα20 cambiando el nucleótido 2563 en pDSRa19 de una "guanósina" a una "adenósina" mediante mutagénesis dirigida al sitio).

Para preparar ADNc que codifica para la cadena pesada de 16H anti-B7RP1, el cebador de PCR en 5' codificó para el extremo amino-terminal de la secuencia señal, un sitio de enzima de restricción XbaI y una secuencia de Kozak optimizada (5'-ACA ACA AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA GTT GGG GCT GAA CTG G-3') (SEQ ID NO: 64). El cebador en 3' codificó para el extremo carboxilo de la región variable, incluyendo un sitio BsmBI de la cadena sentido que se produce de manera natural (5'-GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG ATT CC-3'; SEQ ID NO: 65). Se purificó el producto resultante, se digirió con XbaI y BsmBI, se aisló en gel y se ligó al vector pDSRα20 que contenía la región constante de IgG1 humana y también en el vector pDSRα20 que contenía la región constante

de IgG2 humana. Se clonaron todas las regiones variables de cadena pesada anti-B7RP1 derivadas de hibridoma, independientemente de la región constante nativa asociada, tal como se describió anteriormente en ambos vectores pDSR α 20 que contenían las regiones constantes de IgG1 humana e IgG2 humana.

Ejemplo 3

5 Expresión de anticuerpos anti-B7RP1 en células de ovario de hámster chino (CHO)

Se logró la expresión estable del AcM anti-B7RP1 16H mediante cotransfección de los plásmidos 16H-cadena pesada/pDSR α 19 IgG2 B7RP1-kappa/pDSR α 19 en células de ovario de hámster chino (CHO) adaptadas a medio libre de suero deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) usando un método de fosfato de calcio (la longitud completa de la secuencia de la cadena pesada de 16H se muestra en SEQ ID NO: 44; la secuencia de la cadena kappa de 16H se muestra en SEQ ID NO: 45). Se seleccionaron las células transfectadas en medio que contenía suero dializado pero que no contenía hipoxantina-timidina para garantizar el crecimiento de células que expresan la enzima DHFR. Se examinaron los clones transfectados usando ensayos tales como ELISA con el fin de detectar la expresión del AcM anti-B7RP1 16H en el medio condicionado. Se sometieron los clones de expresión más alta a concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) para la amplificación de DHFR. Se examinaron los clones amplificados por MTX usando ensayos tales como ELISA con el fin de detectar la expresión superior del AcM anti-B7RP1 16H en el medio condicionado. Se sometieron los clones de expresión más alta a subclonación para obtener una población homogénea y la creación de bancos de células.

Pueden generarse otros anticuerpos anti-B7RP1 recombinantes de la invención en células de ovario de hámster chino deficientes en DHFR usando el mismo protocolo descrito anteriormente para el anticuerpo monoclonal anti-B7RP1. Se clonan las secuencias de ADN que codifican para la cadena pesada o la cadena ligera completa de cada anticuerpo anti-B7RP1 de la invención en vectores de expresión. Se cotransfectan las células CHO con un vector de expresión que puede expresar una cadena pesada completa y un vector de expresión que expresa la cadena ligera completa del anticuerpo anti-B7RP1 apropiado. Por ejemplo, para generar un anticuerpo anti-B7RP1 5D, se cotransfectan las células con un vector que puede expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 47 y un vector que puede expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48. La tabla 2 resume las cadenas ligeras completas a modo de ejemplo y las cadenas pesadas completas a modo de ejemplo para los anticuerpos anti-B7RP1 que tienen regiones constantes de cadena pesada de IgG humana. Un experto en la técnica reconocerá que la IgG1 o IgG2 podrían sustituirse entre sí (es decir cuando se enumera IgG1 en la tabla, IgG2 podría estar presente, y viceversa). Alternativamente, podría usarse cualquier otra inmunoglobulina (por ejemplo, IgM, IgA, IgE o IgH) para generar anticuerpos de la invención.

Tabla 2

Anticuerpo	Región variable de cadena pesada + región constante de cadena pesada	Cadena pesada completa
16H(IgG2)	SEQ ID NO: 7 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 44
16H(IgG1)	SEQ ID NO: 7 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 70
16Hg(IgG2)	SEQ ID NO: 8 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 46
16Hg(IgG1)	SEQ ID NO: 8 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 71
5D(IgG1)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 47
5D(IgG2)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 72
2H(IgG2)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 49
2H(IgG1)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 73
2Hg(IgG2)	SEQ ID NO: 11 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 51
2Hg(IgG1)	SEQ ID NO: 11 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 74
43H(IgG2)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 52
43H(IgG1)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 75
41H(IgG2)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 54
41H(IgG1)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 76
15H(IgG2)	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 56
15H(IgG1)	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 57
Anticuerpo	Región variable de cadena ligera + región constante de cadena ligera	Cadena ligera completa
16H	SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 45
5D	SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 48
2H	SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 50
43H	SEQ ID NO: 6 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 53
41H	SEQ ID NO: 5 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 55

15H	SEQ ID NO: 4 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 58
-----	------------------------------	---------------

Ejemplo 4

Producción de anticuerpo anti-B7RP1

Se produce anticuerpo anti-B7RP1 mediante expresión en una línea clonal de células CHO. Para cada ronda de producción, se descongelan células de un único vial en medios de cultivo celular libres de suero. Se hacen crecer las células inicialmente en un frasco en T seguido por frascos centrifugadores y luego se hicieron crecer en reactores de acero inoxidable de escala creciente hasta un biorreactor de 2000 l. Se lleva a cabo la producción en un biorreactor de 2000 l usando un cultivo de alimentación discontinua, en el que se añade una alimentación de nutrientes que contiene componentes de medios concentrados para mantener el crecimiento celular y la viabilidad del cultivo. La producción dura durante aproximadamente dos semanas, tiempo durante el cual las células producen de manera constitutiva anticuerpo anti-B7RP1 y se secreta al medio de cultivo celular.

El reactor de producción se controla a un pH, temperatura y nivel de oxígeno disuelto predeterminados: el pH se controla mediante gas de dióxido de carbono y adición de carbonato de sodio; el oxígeno disuelto se controla mediante los flujos de aire, nitrógeno y oxígeno.

Al final de la producción, se alimenta el caldo celular a una centrifuga de pila de discos y se separa el sobrenadante de cultivo de las células. Se clarifica adicionalmente el concentrado a través de un filtro de profundidad seguido por un filtro de 0,2 μm . Entonces se concentran los medios condicionados clarificados mediante ultrafiltración de flujo tangencial. Se concentran los medios condicionados de 15 a 30 veces. Entonces el medio condicionado concentrado resultante o bien se procesa a través de purificación o bien se congela para su purificación en una fecha posterior.

Ejemplo 5

Modificación a la línea germinal del AcM 16H

La alineación de secuencias del anticuerpo 16H con secuencias de línea germinal humana mostró que la secuencia de región de marco en la región variable del anticuerpo 16H tenía una identidad máxima con las secuencias de línea germinal V_H 3-07 y JH4 con sólo tres diferencias de aminoácido (figura 1A). Se encontró que la secuencia de región de marco para la región VK del anticuerpo 16H era idéntica a la secuencia de línea germinal VK1-L15. Teóricamente es posible que las hipermutaciones somáticas se reconozcan como foráneas por la respuesta inmunitaria de un paciente; en cuyo caso el paciente generaría una respuesta anti-idiotipo que neutralizaría la respuesta terapéutica. Para reducir esta posibilidad, los tres cambios de aminoácido en la región de marco VH se convirtieron de nuevo a las secuencia de línea germinal V_H 3-07 y JH4 (figura 1A). Puesto que los segmentos génicos V_H y J_H de línea germinal están presentes en cada genoma humano, no es probable que la versión de la línea germinal de 16H se reconozca como foránea por la respuesta inmunitaria de un paciente al que se dosifica. Se realizaron bioensayos de coestimulación en placa para determinar si los anticuerpos modificados a la línea germinal podrían inducir la proliferación de células T con una CI₅₀ similar a la CI₅₀ de los anticuerpos no modificados a la línea germinal. Se realizaron los ensayos de coestimulación tal como se describe a continuación usando anticuerpo anti-CD3, y la proteína de fusión hB7RP-1-Fc confirmó que este anticuerpo modificado a la línea germinal, denominado 16Hlínea germinal o 16Hg, conserva sus actividades biológicas (figura 1B).

Ejemplo 6

Medición por afinidad de anticuerpos monoclonales mediante Biacore® y KinExA

Se purificaron tres anticuerpos (5D y 16H, preparados tal como se describe en el ejemplo 1, y 16Hlínea germinal, preparado tal como se describe en el ejemplo 5) y se sometieron a análisis de afinidad de unión. Se inmovilizó B7RP1-Fc a una alta densidad en un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de amina convencional. Entonces se incubó una concentración fija de AcM con concentraciones variables de B7RP-1 o B7RP1-Fc durante al menos ocho horas a temperatura ambiente para permitir que alcanzaran el equilibrio. Entonces se inyectaron las muestras sobre la superficie de B7RP1-Fc, y la señal de unión observada representaba el anticuerpo libre que quedaba en disolución en el equilibrio. Usando dos concentraciones de anticuerpo diferentes (0,2 nM y 1 nM), se calculó la K_D de la interacción entre un AcM particular y ligando a partir del análisis de regresión no lineal de las curvas de competición usando un modelo de unión homogénea de un sitio de curva doble (Adamczyk *et al*, 1999, Bioconjugate Chem. 10:1032-37; Adamczyk *et al*, 2000, Methods 20:319-28). Tal como se muestra en la figura 2 y la tabla 3, los AcM 16H, 16Hg y 5D se unían todos tanto a B7RP-1 soluble como a proteínas de fusión B7RP-1-Fc a altas afinidades. Además, los resultados indicaron que el 16H (distinto de la línea germinal) y el 16Hg (de línea germinal) reaccionaban de manera similar, demostrando que la modificación a la línea germinal no afectó significativamente a la unión entre el anticuerpo y el ligando.

Tabla 3

Resumen de valores de K _D		
	B7RP-1	B7RP1-Fc

5D	37 pM	1,6 pM
16H	1,9 nM	27 pM
16H (de línea germinal)	2,7 nM	17 pM

También se sometió a prueba la unión de los anticuerpos de línea germinal 5D, 2H y 2H usando la tecnología KinExA (ensayo de exclusión cinética). En este ensayo, se acopló hB7RP-1 a perlas de agarosa. Se usaron las perlas para crear una columna de perlas. Entonces se hicieron pasar muestras que contenían anticuerpo a una concentración fija, que se permitió que llegaran al equilibrio con concentraciones variables de hB7RP-1, sobre la columna de perlas. El anticuerpo no complejado con ligando se unió a las perlas recubiertas.

Se usó un anticuerpo secundario anti-Fc humana con etiqueta fluorescente para detectar anticuerpo de prueba unido. La señal obtenida era proporcional al anticuerpo libre en disolución a una concentración de ligando dada. Usando dos concentraciones de anticuerpo diferentes, se calculó la K_D de la interacción a partir del análisis de regresión no lineal de las curvas de competición usando un modo de unión homogénea de un sitio de curva doble (Adamczyk *et al*, 1999, Bioconjugate Chem. 10:1032-37; Adamczyk *et al*, 2000, Methods 20:319-28). Las figuras 3, 4 y 5 muestran el ajuste de curva doble para los anticuerpos 5D, 2H y 2H (línea germinal). Usando esta técnica, se observó una diferencia de aproximadamente 10 veces en las K_D para los anticuerpos 5D y 2H.

Los resultados de los ensayos Biacore® y KinExA demostraron que el anticuerpo 5D tiene una afinidad superior por hB7RP-1 que o bien 2H o bien 16H. Además, la versión de la línea germinal del anticuerpo 2H no muestra una diferencia significativa con respecto al constructo distinto de la línea germinal.

Ejemplo 7

Características funcionales de los anticuerpos anti-B7RP1

Se evaluaron las características funcionales de anticuerpos frente a B7RP-1 de la invención usando ensayos de unión-competición, ensayos de coestimulación *in vitro* y ensayos de toxoide tetánico *in vitro*.

Estudios de unión-competición

Se realizaron estudios de unión-competición con los AcM 16H para demostrar que pueden competir con la unión de ICOS para B7RP-1. En primer lugar se incubaron células CHO transfectadas con un gen que codifica para B7RP-1 humana de longitud completa con cantidades decrecientes de AcM 16H no marcado y se tiñeron posteriormente con una proteína de fusión ICOS-Fc marcada fluorescentemente. Entonces se analizaron las células usando citometría de flujo. Tal como se muestra en la figura 6, ICOS-Fc tiñó las células CHO transfectadas con B7RP-1; 0,4 µg/ml de AcM 16H no afectó a la unión de ICOS-Fc. Sin embargo, 6 y 25 µg/ml de 16H separaron por competición eficazmente la unión de ICOS-Fc, indicando que el AcM 16H competía de hecho con la unión de ICOS en B7RP-1.

Ensayos de coestimulación

Se recubrieron placas de cultivo celular (Falcon, n.º de cat. 353077, fondo de U) con anticuerpos anti-CD3 humano 1 µg/ml (n.º de cat. de PharMingen 555336) y anticuerpo anti-IgG humana 10 µg/ml (específico de Fc, n.º de cat. de Sigma I3391). Se añadieron a cada pocillo (100 µl/pocillo) los anticuerpos anti-CD3 y anti-inmunoglobulina humana en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se incubaron las placas recubiertas a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces se lavaron las placas con PBS dos veces. Tras lavar, se añadieron a cada pocillo (100 µl por pocillo) B7-2Fc humana 1 µg/ml (R&D System, n.º de cat. 141-B2) o hB7RP1Fc 5 µg/ml, cada uno diluido en PBS. Entonces se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 3 horas y se lavaron dos veces con PBS después de eso. Se añadieron células T humanas purificadas (1×10^5 por pocillo) en 200 µl de volumen de medio (RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal al 10% (FCS), penicilina-estreptomina-L-glutamina (PSG), β-mercaptoetanol (2-ME), aspartato de N-acetilo (NAA) y piruvato de Na) y se incubaron a 37°C, el 5% de CO₂ durante 48 horas. Se añadió ³H timidina (n.º de cat. de ICN 2404205) a 1 µCi/pocillo y se incubaron las células durante la noche a 37°C, el 5% de CO₂. Entonces se recogieron las células y se contaron.

Se recubrieron placas de cultivo celular (Falcon, n.º de cat. 353077, fondo de U) con anticuerpos anti-CD3 humano 0,1 µg/ml como anteriormente. Se añadieron células CHO transfectadas con hB7RP1 (irradiadas con 5000 RAD) a 2×10^4 por pocillo seguido por células T humanas purificadas a 1×10^5 por pocillo en un volumen de 200 µl. Se incubaron las placas a 37°C, el 5% de CO₂ durante 48 horas como anteriormente. Se añadió ³H timidina a 1 µCi/pocillo. Se incubaron las células durante la noche, se recogieron y se contaron como anteriormente.

Ensayos de toxoide tetánico

Se purificaron PBMC a partir de sangre humana usando un gradiente de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) tal como sigue. Se diluyó sangre 1:2 con PBS, se estratificó la sangre diluida en la parte superior del Ficoll (1/3 de Ficoll a temp. ambiente + 2/3 de sangre diluida), se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente, se eliminó por aspiración la capa superior (plasma y plaquetas) y se transfirió la capa de células mononucleares a un tubo de 50 ml nuevo. Se lavaron las PBMC aisladas con PBS (3x el volumen de la capa de células mononucleares) y

se centrifugaron durante 10 minutos a 1300 rpm a temperatura ambiente y se lavaron como anteriormente. Se resuspendieron las PBMC en medio (RPMI 1640 + FBS inactivado por calor al 10% + 1X PSG + 1X NEAA + 2-ME 55 µM) y se contaron las células.

5 Se añadieron las PMBC a los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos a 100 µl de PBMC/pocillo (3x10⁶/ml). Se añadió toxoide tetánico (20 µg/ml; Universidad de Massachusetts) para una concentración final de 5 µg/ml. Se incubaron las células durante 3 días a 37°C; se recogieron 100 µl de sobrenadante y se incubaron durante una adición de 6 a 8 horas en presencia de ³H-timidina 1 µCi/pocillo (MP Biomedicals). Entonces se recogieron las células y se contaron.

10 La tabla 4 resume las características funcionales de determinados anticuerpos de la invención tal como se determinan usando los ensayos descritos anteriormente.

Tabla 4

	Placa	Biacore Fc	Biacore mono	CHO	Toxoide tetánico
2H	43	89		1445	15
15H	36				141
16H	53	27	1900	276	27
16Hg	32	17	2700	523	
41H	52				115
43H	46				35
5D	55	1,6	37	1456	15
ICOS-Fc	200-1000	1000		10.672	
α-CD86					40

*Valores de CE₅₀/KD en pM

Ejemplo 8

15 Mapeo de epítomos

Se realizaron experimentos para identificar la región en B7RP-1 a la que se unen los anticuerpos monoclonales 16H/16Hg y 5D. Para hacer esto, se desarrolló un ensayo de unión por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se expresaron el dominio extracelular (ECD) humano de B7RP1 (SEQ ID NO: 66) así como formas truncadas de B7RP-1 que contenía o bien la Igl (tipo IgV; SEQ ID NO: 67) o la Ig2 (tipo IgC; SEQ ID NO: 68) como fusiones N-terminales, en marco con avidina de pollo.

20

SEQ ID NO: 66 (ECD):

**DTQEKEVRAMVGSDELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVITYHI PQNSSLENVDSRYRNRALMS
PAGMLRGDFSLRFLFNVTTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVAANFVSPVVSAPHSPSQDELTF
TCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCC IENVLLQQN
LTVGSQTGNDIGERDKITENP**

SEQ ID NO: 67 (tipo IgV):

**DTQEKEVRAMVGSDELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVITYHI PQNSSLENVDSRYRNRALMS
PAGMLRGDFSLRFLFNVTTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVAANFVSPVVSAPHSPSQDELTF
T**

25 SEQ ID NO: 68 (tipo IgC):

**LGFQEVLSVEVTLHVAANFVSPVVSAPHSPSQDELTF TCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDT
VFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCC IENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENP**

30

Se transfectaron de manera individual y transitoria vectores de expresión que contenían genes que codificaban para estas proteínas de fusión en células 293T y se usaron los medios condicionados de estas líneas celulares como fuente de proteína de fusión. Se usó la etiqueta de avidina para capturar las proteínas de fusión de B7RP1 de la disolución usando una perla recubierta con biotina. Se incubaron las proteínas de fusión con o bien los AcM 5D o 16H marcados fluorescentemente o bien una proteína de fusión ICOS-Fc marcada fluorescentemente, y se

incubaron con perlas recubiertas con biotina. Se recuperaron las perlas y se analizaron usando citometría de flujo en un instrumento FACScan de Becton-Dickinson Bioscience (BD, Franklin Lakes, NJ). Tal como se muestra en la figura 9A, se detectó la tinción fluorescente de las perlas con los reactivos 16H, 5D e ICOS cuando se unió el ECD completo de B7RP-1, indicando que estos tres reactivos podían unirse al ECD de B7RP-1. De manera similar, los tres reactivos se unieron a la proteína de fusión de avidina que contenía sólo el dominio de Ig1, indicando que tanto ICOS y como los AcM anti-B7RP-1 bloqueantes podían unirse a esta región. En cambio, ni ICOS ni los AcM anti-B7RP-1 podían unirse a la proteína de fusión que contiene sólo el dominio de Ig2 proximal a la membrana. Por tanto, las regiones de unión de ICOS, 16H y 5D en B7RP-1 se ubicaron en el dominio de Ig1.

Los anticuerpos generados tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1 y sometidos a prueba para detectar la unión usando el ensayo de unión a fusión de avidina pudieron dividirse en dos clases de epítomos, H y D, tal como se muestra en la tabla 5. De los 100 anticuerpos seleccionados inicialmente basándose en su capacidad para unirse a B7RP1, 15 no pudieron unirse en el ensayo de unión a fusión de avidina, lo más probablemente debido a degradación.

Tabla 5

Clasificación de AcM por epítomo	
Clase	N.º
Epítomo H	75
Epítomo D	10
Nuevo epítomo, bloqueante de ICOS	0
Nuevo epítomo, no bloqueante de ICOS	0
Sin unión detectable	15

Ejemplo 9

Identificación de SNP y análisis funcional

Se identificó una variante de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) principal en B7RP-1 que está presente en la población con una frecuencia alélica del 28,4% (figura 7). Se identificó la variante dentro de la secuencia que codifica para la proteína madura. Una búsqueda en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) reveló una segunda variante de SNP posible; la segunda variante se identificó en un análisis de 1,5 individuos (tres cromosomas). La primera variante de SNP (V128I) se ubicó en el primer dominio de tipo IgV, mientras que la variante de SNP del NCBI (L221F) se ubicó en el segundo dominio de tipo IgC.

Tal como se comentó anteriormente, los anticuerpos monoclonales tanto 16H como 5D se unen al primer dominio de tipo IgV, es improbable que esta última variante L221F afecte a la unión o función del AcM o bien 16H o bien 5D. No obstante, para determinar si cualquiera de estas variantes de SNP afecta a la unión y/o función de 16H o 5D, se realizaron dos experimentos diferentes. En el primer conjunto de experimentos, se construyeron proteínas de fusión de avidina con las dos variantes de SNP y se sometieron a prueba para detectar la unión a los anticuerpos 16H o 5D en el ensayo de citometría de flujo tal como se describió anteriormente. Estos AcM representativos de las clases de epítomo H y D se unían a las variantes de SNP con eficacia similar que la B7RP-1 silvestre (figura 9B). Estos datos sugerían que los anticuerpos de las clases de epítomo tanto H como D se unen a las variantes de SNP de B7RP-1.

En el segundo enfoque, se construyeron proteínas de fusión de Fc usando las secuencias de variantes de SNP de B7RP-1 y se compararon para determinar la capacidad de estas proteínas para estimular células T en el ensayo de coestimulación en placa (figura 9C). Los anticuerpos tanto 16H como 5D inhibieron la coestimulación mediada por las proteínas de fusión de Fc variantes de SNP con CE₅₀ similares a la proteína de fusión silvestre. Tomados conjuntamente, estos datos indican que las dos posibles variantes de SNP de B7RP-1 se reconocían por los anticuerpos de la invención. Por tanto, los anticuerpos de la invención pueden unirse a una diana en pacientes que contiene estas variantes de SNP.

Ejemplo 10

Modelos de eficacia animal *in vivo*

Se analizó la capacidad de los anticuerpos B7RP-1 para inhibir la respuesta inmunitaria usando un anticuerpo monoclonal de rata murinizado anti-B7RP-1 murina (1B7v2) y exponiendo ratones BALB/c a hemocianina de lapa californiana (KLH).

Generación del anticuerpo monoclonal de rata murinizado anti-B7RP-1 murina 1B7v2

Se inyectó en ratas una línea de células de ovario de hámster chino que sobreexpresaba una B7RP-1 murina de longitud completa como inmunización primaria, y posteriormente una proteína de fusión B7RP-1 murina-Fc para reforzar la respuesta inmunitaria. Se recogieron los bazo 3 ó 4 días tras el refuerzo intravenoso y se fusionaron las células B esplénicas con la línea de mieloma de rata Y3-Ag1.2.3 (ATCC CRL-1631). Entonces se seleccionaron las

células en medios complementados con hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT) durante 2 semanas y posteriormente se subclonaron células individuales mediante dilución limitante. Estos procedimientos se describen en "Practical Immunology, 2ª ed". Leslie Hudson y Frank C. Hay; Blackwell Scientific Publications 1980.

5 Se clonaron genes que codifican para la inmunoglobulina 1B7 de la línea celular 1B7 usando procedimientos convencionales (Sambrook *et al*, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Se logró el cambio de isotipo de los AcM anti-huB7RP1 humanos clonando los fragmentos de región variable que contenían los extremos cohesivos de sitios de restricción XbaI y BsmBI en el vector pDSRa con la región constante de IgG1 o hulgG2 humana que también tenía extremos de XbaI y BsmBI. Para el anticuerpo de rata anti-muB7RP1 1B7 se formó la quimera mediante un procedimiento de PCR solapante de tres etapas. Se amplificó por PCR la región variable de rata con un cebador en 3' que contenía parte, ~25-35 nucleótidos, de la región constante murina. Se amplificó la región constante murina con un cebador en 10 5' que contenía parte, ~25-35 nucleótidos, de la región variable de rata. Entonces se usaron los dos fragmentos como molde y se usaron los cebadores de región variable de rata en 5' (que contenía XbaI) y de región constante en 3' murina (que contenía Sall) para generar una cadena ligera o cadena pesada completa. Entonces se digirieron los productos de PCR de cadena ligera y cadena pesada con XbaI y Sall y se clonaron en pDSRa19. Se transfectaron un total de 25 µg de ADN linealizado (12,5 µg de pDC323B LC + 12,5 µg de pDC324 HC) en células CS-9 usando electroporación y se seleccionaron en medio complementado con DHFR.

Para someter a prueba la eficacia del AcM 1B7v2, se realizaron ensayos de coestimulación en placa con este AcM. Se compararon los resultados con otros AcM anti-B7RP-1 murina (figura 10A). Tal como se comentó anteriormente, 1B7 es el AcM producido en hibridoma original; se sometieron a prueba dos preparaciones diferentes (marcadas como 1.33 y 7.4). 5E1 y 11G10 fueron otros anticuerpos monoclonales anti-mB7RP-1 generados en las fusiones descritas anteriormente. Finalmente, HK5.3 era un anticuerpo anti-mB7RP-1 disponible comercialmente (ebiosciences n.º 16-5985-85).

El AcM 1B7v2 bloqueó la activación de células T en este ensayo igual o mejor que cualquiera de los otros AcM, y por tanto se seleccionó como producto terapéutico sustituto para estudios adicionales.

Exposición con antígeno en ratones

Se adquirió hemocianina de lapa californiana (KLH) de Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois). Se preparó la disolución de dosificación n.º 1 (KLH 5 mg/kg en ALUMBRE 1 mg/ratón) con partes iguales de 2x ALUM (500 mg de ALUM más 50 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato)) y 2x KLH (2,0 ml de dH2O (libre de ARNasa) mezclada con 20 mg de KLH liofilizada, enrasada a 20 ml con 1x PBS). Se preparó la disolución de dosificación n.º 2 (KLH 1 mg/kg en ALUMBRE 1 mg/ratón) con 1 parte de 2x KLH mezclada con 4 partes de 1x solución salina tamponada con fosfato.

Se sensibilizaron ratones BALB/c hembra o bien con 1 mg/kg de KLH/alumbre y volvieron a inmunizarse en el día 21 con KLH 5 mg/kg sólo, introducida mediante inyección intraperitoneal. Se trataron los ratones mediante inyección intraperitoneal con 1B7v.2, el anticuerpo control de isotipo (anti-AGP3 PB) o el vehículo (PBS) solo, comenzando en el día 1 (un día antes de la sensibilización con KLH/alumbre) en un volumen final de 200 µl cada 5 días.

Se extrajo sangre de los ratones cada 7 días por vía retroorbital (aproximadamente 200 µl) para obtener aproximadamente 50-100 µl de suero para el análisis de IgM (figura 10B), IgG2a (figura 10C) e IgG1 (figura 10D) en suero específicas de antígeno. Tanto los ratones tratados con vehículo como con control de isotipo mostraron respuestas inmunitarias primarias y secundarias significativas. La respuesta de IgM no se vio afectada por el tratamiento, mientras que el bloqueo de B7RP-1/ICOS con 1B7v2 disminuyó las respuestas de IgG2a e IgG1 tanto primarias como secundarias de una manera estadísticamente significativa.

IL-5 es una citocina liberada por células T en respuesta a la estimulación con antígeno que induce la diferenciación y función de células B. Puesto que se cree que la interacción B7RP-1/ICOS es crítica para la función de células B dependiente de células T, se usó la medición de los niveles de IL-5 en suero para determinar si la supresión del eje B7RP-1/ICOS estaba de hecho afectando a la función de células T. Tal como se esperaba, el bloqueo de B7RP-1 también inhibió los niveles de IL-5 en suero inducidos por antígeno. Se recogieron sueros de los ratones del experimento de exposición a antígeno explicado resumidamente más de 24 horas después de la exposición a antígeno en el día 21, y se determinaron los niveles de IL-5 en suero mediante ELISA. Tal como se muestra en la figura 11, se detectaron niveles de IL-5 elevados en los ratones de prueba ya a las 9 horas tras la exposición; los niveles comenzaron a disminuir a las 48 horas y regresaron al nivel inicial a las 72 horas. El tratamiento de los ratones con el AcM 1B7v2 condujo a una represión estadísticamente significativa de los niveles de IL-5 en el punto de tiempo de 24 horas.

Ejemplo 11

Unión a B7RP-1 de mono cynomolgus

Para determinar si los AcM anti-hB7RP-1 también se unen a B7RP-1 de mono cynomolgus, se realizaron

experimentos de tinción por citometría de flujo con el AcM 16H y células B purificadas de monos cynomolgus y seres humanos. Tal como se muestra en la figura 12A, la adición de 16H marcado fluorescentemente a células B de mono cynomolgus condujo a tinción, indicando que 16H estaba de hecho uniéndose a B7RP-1 de mono cynomolgus (panel derecho). Tal como se esperaba, 16H también tiñó células B humanas (panel izquierdo). Además, se sometieron a prueba 16H, 16Hg y 5D en ensayos de coestimulación en placa usando células T de mono cynomolgus, B7RP-1-Fc de mono cynomolgus y AcM anti-CD3. Tal como se muestra en la figura 12B, los tres AcM inhibieron la activación de células T de mono cynomolgus dependiente de B7RP-1, indicando que estos AcM bloquean funcionalmente la interacción ICOS-B7RP-1 de mono cynomolgus.

Ejemplo 12

10 Respuestas de antígenos dependientes de células T en el mono cynomolgus tras la administración de los anticuerpos anti-B7RP-1

15 Se realizó un estudio en mono cynomolgus con dos anticuerpos monoclonales anti-B7RP-1, 16H y 5D, para evaluar la capacidad de estos anticuerpos de inhibir una respuesta a antígenos de células B dependiente de células T tal como se determina mediante los niveles en suero de anticuerpo específico de antígeno. En resumen, se examinaron las respuestas de anticuerpo anti-hemocianina de lapa californiana (KLH) y anti-toxoide tetánico tras la exposición a antígeno en presencia de anticuerpos frente a B 7RP-1 en el mono cynomolgus.

El artículo de prueba 1 fue 16H y el artículo de prueba 2 fue 5D. El artículo de control fue el vehículo para anticuerpo frente a B7RP-1 (acetato de sodio 0,01, pH 5,0, sorbitol al 5%, Tween 20 al 0,004%). Se adquirió hemocianina de lapa californiana (KLH) de Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois).

20 Se preparó la KLH mediante reconstitución con agua estéril para producir una disolución madre de 10 mg/ml. Se diluyó la disolución madre con agua estéril para producir una disolución de dosificación de 1 mg/ml. El toxoide tetánico usado para estos experimentos fue toxoide tetánico Super-Tet[®] w/Havlogen[®], adquirido de Intervet[™] Inc. (Millsboro, Delaware). El nivel de dosis para estos experimentos fue 75 UI (0,5 ml de 150 UI/ml).

La tabla 6 muestra la distribución de grupos de tratamiento de 28 monos cynomolgus.

25 Tabla 6

Grupo n.º	Número de machos/hembras	Artículo de prueba	Vía	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)	Conc. de disolución de dosis (mg/ml)
1	2/2	Control	i.v.	0	1	0
2	2/2	B7RP-1 5D	i.v.	0,1	1	0,1
3	2/2	B7RP-1 5D	i.v.	1,0	1	1,0
4	2/2	B7RP-1 5D	i.v.	8,0	1	10,0
5	2/2	B7RP-1 16H	i.v.	0,1	1	0,1
6	2/2	B7RP-1 16H	i.v.	1,0	1	1,0
7	2/2	B7RP-1 16H	i.v.	8,0	1	10,0

30 Se administraron dosis de artículo de prueba por medio de inyección intravenosa a todos los animales en los días 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50. Los animales programados para necropsia en los grupos 1-4 (1/sexo/grupo) recibieron una dosis adicional en el día 57. Se realizó la evaluación de la respuesta inmunitaria en todos los animales por medio de inmunización con los antígenos KLH y toxoide tetánico seguido por toma de muestras de sangre para detectar inmunoglobulinas específicas de antígeno (IgM e IgG).

35 Estaban presentes valores de títulos tras la administración primaria de los antígenos tanto KLH como tétanos. Para KLH, los valores de títulos primarios oscilaron entre 0 y 900 para tanto IgM como IgG. Como la exposición a KLH primaria se administró antes de la administración del artículo de prueba, no se evaluó ningún efecto de los anticuerpos frente a B7RP-1. Para toxoide tetánico, los valores de títulos primarios oscilaron entre 0 y 50 para IgM y entre 0 y 4050 para IgG. No hubo diferencias en la respuesta primaria a toxoide tetánico entre los grupos de anticuerpo frente a B7RP-1 y el grupo control.

40 Tal como se esperaba, los valores de títulos para IgG aumentaron tras la administración secundaria de los antígenos tanto KLH como tétanos, en comparación con los valores de títulos primarios. Para KLH, los valores de títulos secundarios oscilaron entre 0 y 300 para IgM y entre 0 y 8100 para IgG. Sin embargo, no hubo pruebas de inhibición de la respuesta secundaria a KLH atribuida a la administración de los anticuerpos frente a B7RP-1.

Para el toxoide tetánico, los valores de títulos secundarios estaban por debajo de 50 para IgM y oscilaron entre 1350 y 36450 para IgG. Los resultados para valores medios de grupos y animales individuales se presentan en la figura 13A (anticuerpo 16H) y la figura 13B (anticuerpo 5D) durante los días 53 y 57 tras la exposición secundaria con toxoide tetánico en el día 42.

45 En el día 53, el número de animales que alcanzaban una respuesta máxima era de 3/4, 1/4 y 1/4 a los niveles de

5 dosis de 0,1, 1 y 8 mg/kg de 16H, respectivamente, y de 1/4, 1/4 y 1/4 a los niveles de dosis de 0,1, 1 y 8 mg/kg de 5D respectivamente, en comparación con 2/4 animales control. Por tanto, en general, el número de animales que alcanzaban un alto título en el día 53 se redujo en los grupos tratados con anticuerpo frente a B7RP-1. En el día 57, los valores de títulos se mantuvieron en los animales control, mientras que los valores de títulos para varios de los animales tratados con anticuerpo B7RP-1 disminuyeron con respecto a los valores del día 53. El número de animales con altos títulos en el día 57 era de 0/4, 0/4 y 1/4 a los niveles de dosis de 0,1, 1 y 8 mg/kg de 16H, respectivamente, y de 0/4, 0/4 y 0/4 a los niveles de dosis de 0,1, 1 y 8 mg/kg de 5D respectivamente, en comparación con 2/4 animales control.

10 Estos resultados demostraron que los dos anticuerpos frente a B7RP-1 16H y 5D inhibían una respuesta a antígenos de células B dependiente de células T en monos cynomolgus, tal como se determina por los niveles en suero de anticuerpo específico de toxoide tetánico. Además, la presencia de los anticuerpos frente a B7RP-1 era importante para el bloqueo de la interacción B7RP-1-ICOS durante la respuesta primaria con el fin de detectar un efecto tras la exposición secundaria.

15 Estos resultados y los resultados del ejemplo 10 demostraron que los candidatos terapéuticos y terapéuticos sustitutos bloquearon respuestas inmunitarias dependientes de células T y B en sistemas modelo de mono y murinos, lo que indicó que el bloqueo de este eje coestimulador puede ser eficaz en el tratamiento de enfermedades mediadas por células B tales como lupus eritematoso sistémico (SLE), asma y artritis reumatoide (RA).

Lista de secuencias

20 <110> Siu, Jerry
Shen, David
Yoshinaga, Steve
Huang, Haichun

25 <120> Anticuerpos neutralizantes anti-B7RP1 humanos

<130> 04-833

<160> 76

30 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 107

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

<210> 3

<211> 107

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 572 177 T3

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

<210> 4

<211> 108

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ala
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10 <210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 7

ES 2 572 177 T3

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

- <210> 8
- 5 <211> 121
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 8

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

<210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

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

<210> 10
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

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

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

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

Ala Arg Asp Gly Ile Leu Trp Phe Gly Asp Ile Pro Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 11

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

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

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

Ala Tyr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Ile Leu Trp Phe Gly Asp Ile Pro Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 12
 <211> 120

ES 2 572 177 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

5

<210> 13
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 13

ES 2 572 177 T3

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

- <210> 14
- 5 <211> 118
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 14

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

<210> 15
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
 1 5 10

10 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 16
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

20 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

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

5 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

10 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 25
 Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Arg Thr
 1 5

20 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

25 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 27
 Ser Tyr Trp Met Ser
 1 5

35 <210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28
 Tyr Ile Lys Gln Asp Gly Asn Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

40 Gly

45 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29
 Glu Gly Ile Leu Trp Phe Gly Asp Leu Pro Thr Phe
 1 5 10

<210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 30
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 31
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 31
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15
 Gly
 15

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <400> 32
 Asp Leu Asn Ile Met Val Trp Gly Ile Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 33
 Tyr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 34
 Asp Gly Ile Leu Trp Phe Gly Asp Ile Pro Thr Tyr
 1 5 10

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 35

Ser Tyr Ala Met His
 1 5

5 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36
 Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

10 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 37
 Gly Val Pro Leu Leu Trp Phe Gly Glu Phe Tyr
 1 5 10

20 <210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38
 Asp Gly Ile Leu Trp Phe Gly Asp Leu Pro Thr Tyr
 1 5 10

30 <210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 39
 Ala Ile Gly Ala Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

35 <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 40
 Val Val Val Val Val Gly Phe Phe Asp Tyr
 1 5 10

45 <210> 41
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

ES 2 572 177 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

ES 2 572 177 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

5 <210> 42
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

				165					170					175			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
			180					185					190				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
		195					200					205					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
	210					215					220						
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu		
225					230					235					240		
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
			245						250					255			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
			260					265					270				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
		275					280					285					
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		
	290					295					300						
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr		
305					310					315					320		
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
				325					330								

<210> 43
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 43

ES 2 572 177 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

- <210> 44
- 5 <211> 447
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Lys Gln Asp Gly Asn Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Ile Leu Trp Phe Gly Asp Leu Pro Thr Phe Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

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

Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 45

<211> 214

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

ES 2 572 177 T3

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 46

<211> 447

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

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

ES 2 572 177 T3

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

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

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

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 His 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 Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300

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

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

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

Pro Ser Arg 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 Met Leu Asp Ser
 385 390 395 400

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

Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 47

<211> 451

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

ES 2 572 177 T3

				165					170							175
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
			180					185					190			
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
		195					200					205				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
	210					215					220					
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
225					230					235					240	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				245					250					255		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
			260					265					270			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
		275					280					285				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
	290					295					300					
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
305					310					315					320	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
				325					330					335		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			340					345					350			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		355					360					365				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	370					375					380					
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
385					390					395					400	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	

405 410 415

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

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

Pro Gly Lys
450

- <210> 48
- <211> 214
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 48

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 49

<211> 433

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ala Ser Thr Lys Gly
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 115 120 125

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 130 135 140

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
405 410 415

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
420 425 430

Lys

<210> 50

<211> 214

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

ES 2 572 177 T3

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 51

<211> 447

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Ile Leu Trp Phe Gly Asp Ile Pro Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

ES 2 572 177 T3

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

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

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

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

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 His 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 Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300

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

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

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

Pro Ser Arg 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 Met Leu Asp Ser

ES 2 572 177 T3

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

ES 2 572 177 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 53

<211> 214

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

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

165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

- <210> 54
- <211> 447
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- <400> 54

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

ES 2 572 177 T3

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

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

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

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 His 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 Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300

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

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

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

Pro Ser Arg 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 Met Leu Asp Ser
 385 390 395 400

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

Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 55

<211> 214

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 56
<211> 446
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 56

5

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

ES 2 572 177 T3

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
 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 Lys
435 440 445

<210> 57

<211> 450

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Ser Gly Val Pro Leu Leu Trp Phe Gly Glu Phe 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 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 Lys 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
 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 Asp Glu Leu 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> 58

<211> 215

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

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

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 59
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18).. (23)
 <223> n e s a, e, g, o t

15 <400> 59
 ggccggatag gctccannn nnnt 24

20 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 60
 ggggtcaggc tggaactgag g 21

25 <210> 61
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 61
 tgaggacgct gaccacag 19

35 <210> 62
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 62
 cagcagaagc ttctagacca ccatggacat gagggctctc gctcagctcc tggg 54

40 <210> 63
 <211> 34
 <212> ADN

45 <213> *Homo sapiens*
 <400> 63

cttgtcgact caacactctc cctgttgaa gctc 34

<210> 64
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 64
 acaacaaagc ttctagacca ccatggagtt ggggctgaac tgg 43

<210> 65
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65
 gtggaggcac tagagacggt gaccaggatt cc 32

<210> 66
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 66
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro

ES 2 572 177 T3

115		120		125											
His	Ser	Pro	Ser	Gln	Asp	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Cys	Thr	Ser	Ile	Asn
	130					135					140				
Gly	Tyr	Pro	Arg	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Ile	Asn	Lys	Thr	Asp	Asn	Ser
145					150					155					160
Leu	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Asp	Thr	Val	Phe	Leu	Asn	Met	Arg
				165					170					175	
Gly	Leu	Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Val	Leu	Arg	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Ser
			180					185					190		
Val	Asn	Ile	Gly	Cys	Cys	Ile	Glu	Asn	Val	Leu	Leu	Gln	Gln	Asn	Leu
		195					200					205			
Thr	Val	Gly	Ser	Gln	Thr	Gly	Asn	Asp	Ile	Gly	Glu	Arg	Asp	Lys	Ile
	210					215					220				
Thr	Glu	Asn	Pro												
225															

<210> 67
 <211> 139
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 67

ES 2 572 177 T3

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr
130 135

- <210> 68
- 5 <211> 127
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 68

ES 2 572 177 T3

Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val Thr Leu His Val Ala
 1 5 10 15

Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro His Ser Pro Ser Gln
 20 25 30

Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro
 35 40 45

Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala
 50 55 60

Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val
 65 70 75 80

Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys
 85 90 95

Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln
 100 105 110

Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile Thr Glu Asn Pro
 115 120 125

<210> 69
 <211> 39
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 69
 cgacggagca cgaggacacg acaggacgaa ggagagaaa 39

10 <210> 70
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 70

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 71
<211> 451
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 71

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

210						215						220				
Asp 225	Lys	Thr	His	Thr	Cys 230	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala 235	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly 240	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe 245	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys 250	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 255	
Ile	Ser	Arg	Thr 260	Pro	Glu	Val	Thr	Cys 265	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His 270	
Glu	Asp	Pro 275	Glu	Val	Lys	Phe	Asn 280	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly 285	Val	Glu	Val	
His	Asn 290	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro 295	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr 300	Asn	Ser	Thr	Tyr	
Arg 305	Val	Val	Ser	Val	Leu 310	Thr	Val	Leu	His	Gln 315	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly 320	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys 325	Lys	Val	Ser	Asn	Lys 330	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 335	
Glu	Lys	Thr	Ile 340	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly 345	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
Tyr	Thr	Leu 355	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp 360	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn 365	Gln	Val	Ser	
Leu 370	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly 375	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp 380	Ile	Ala	Val	Glu	
Trp 385	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln 390	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr 395	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro 400	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp 405	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu 410	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 415	
Asp	Lys	Ser	Arg 420	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn 425	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met 430	
His	Glu	Ala 435	Leu	His	Asn	His	Tyr 440	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser 445	
Pro	Gly	Lys														

450

<210> 72
<211> 447
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 His 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 Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg 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 Met Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 73
<211> 451
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 73

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

<210> 74
<211> 451
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys

'450

- <210> 75
- <211> 448
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- <400> 75

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 76
<211> 451
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 76

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado que se une específicamente a B7RP1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 27, una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 28 y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 29, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de las mismas, y una cadena ligera que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 15, una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 16 y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 17, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de las mismas, y en el que el anticuerpo inhibe la actividad de B7RP1.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 7 u 8, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
4. Polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 16, 17, 27, 28 y 29, en el que el polipéptido se une específicamente a B7RP1 e inhibe la actividad de B7RP1.
5. Anticuerpo aislado o fragmento según la reivindicación 1 que se une específicamente a B7RP1, en el que el anticuerpo se une a SEQ ID NO: 67 pero no a SEQ ID NO: 68 del dominio extracelular de B7RP1 e inhibe la actividad de B7RP1.
6. Anticuerpo aislado que se une específicamente a B7RP1 y compite con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 u 8 por la unión a B7RP1, en el que el anticuerpo inhibe la actividad de B7RP1.
7. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 45 ó 46, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
8. Anticuerpo según la reivindicación 1, 5 ó 6, en el que la cadena pesada y la cadena ligera comprenden un anticuerpo de cadena sencilla.
9. Anticuerpo según la reivindicación 8, que es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.
10. Anticuerpo según la reivindicación 1, 5 ó 6, que es un anticuerpo Fab.
11. Anticuerpo según la reivindicación 1, 5 ó 6, que es un anticuerpo Fab'.
12. Anticuerpo según la reivindicación 1, 5 ó 6, que es un anticuerpo (Fab')₂.
13. Anticuerpo según la reivindicación 1, 5 ó 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano.
14. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 ó 7 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.
15. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido según la reivindicación 4.
16. Anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 ó 6, para su uso como medicamento.
17. Polipéptido según la reivindicación 4, para su uso como medicamento.
18. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 ó 6 o fragmento de unión a antígeno o fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o respuesta inflamatoria en un paciente.
19. Polipéptido según la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o respuesta inflamatoria en un paciente.

20. Uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 ó 6 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo para la preparación de una composición para tratar una respuesta inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria mediada por B7RP1 en un paciente.
- 5 21. Uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido según la reivindicación 4 para la preparación de una composición para tratar una respuesta inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria mediada por B7RP1 en un paciente.
- 10 22. Uso según la reivindicación 20 ó 21, en el que la enfermedad autoinmunitaria o la respuesta inflamatoria es artritis reumatoide, asma, púrpura trombocitopénica inmunitaria, esclerosis múltiple, diabetes, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto o lupus eritematoso sistémico.
- 15 23. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 ó 6 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo para la preparación de una composición para inhibir la activación de células T por señal coestimuladora en un paciente.
24. Método para detectar B7RP1 en una muestra biológica que comprende:
- a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 ó 6 o el polipéptido según la reivindicación 4 en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o polipéptido con B7RP1; y
- 20 b) medir el nivel de anticuerpo o polipéptido unido en la muestra.
25. Molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 ó 6 o el polipéptido según la reivindicación 4.
26. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en
- 25 (a) SEQ ID NO: 1 y 7,
- (b) SEQ ID NO: 1 y 8,
- (c) SEQ ID NO: 15, 16, 17, 27, 28 y 29,
- (d) SEQ ID NO: 45 y 7,
- (e) SEQ ID NO: 45 y 8, y
- 30 (f) SEQ ID NO: 1 y 46.
27. Célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 25 ó 26.
28. Línea celular aislada que produce un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 ó 6, o el polipéptido según la reivindicación 4.
29. Vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 25 ó 26.
- 35 30. Método de preparación de un anticuerpo o polipéptido que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 27 o la línea celular según la reivindicación 28 y recoger el anticuerpo o polipéptido del medio de cultivo o de la célula huésped.
- 40 31. Anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 45 32. Anticuerpo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; y en el que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.
33. Anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

Figura 1

- A) 16H-VH-G.L. (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFTFSSYWM^{SWVRQAPGKGL}EWVAY
 16H.VH (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGGSGFTFSSYWM^{SWVRQAPGKGL}EWVAY
- 16H-VH-G.L. (51) IKQDGNKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
 16H.VH (51) IKQDGNKYYVDSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
- 16H-VH-G.L. (101) ILWFGDLPTFWGQGTLVTVSS
 16H.VH (101) ILWFGDLPTFWGQGILVTVSS

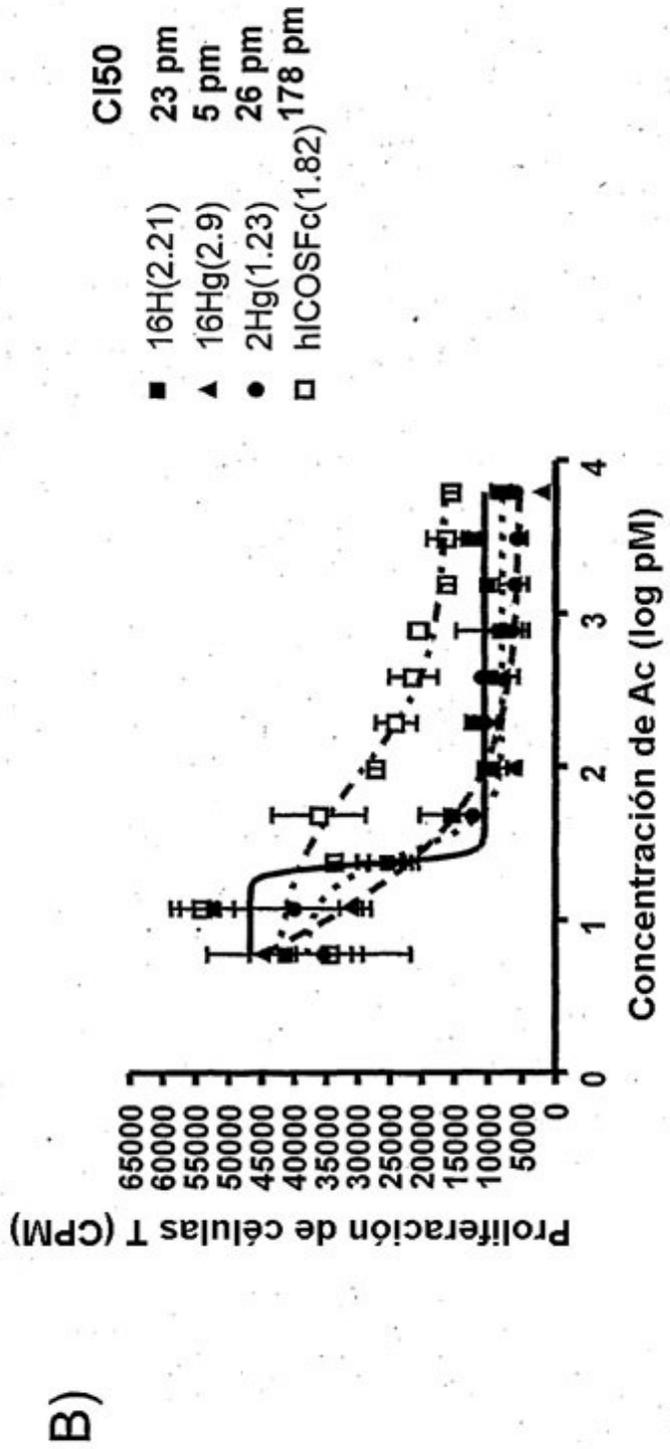


Figura 2

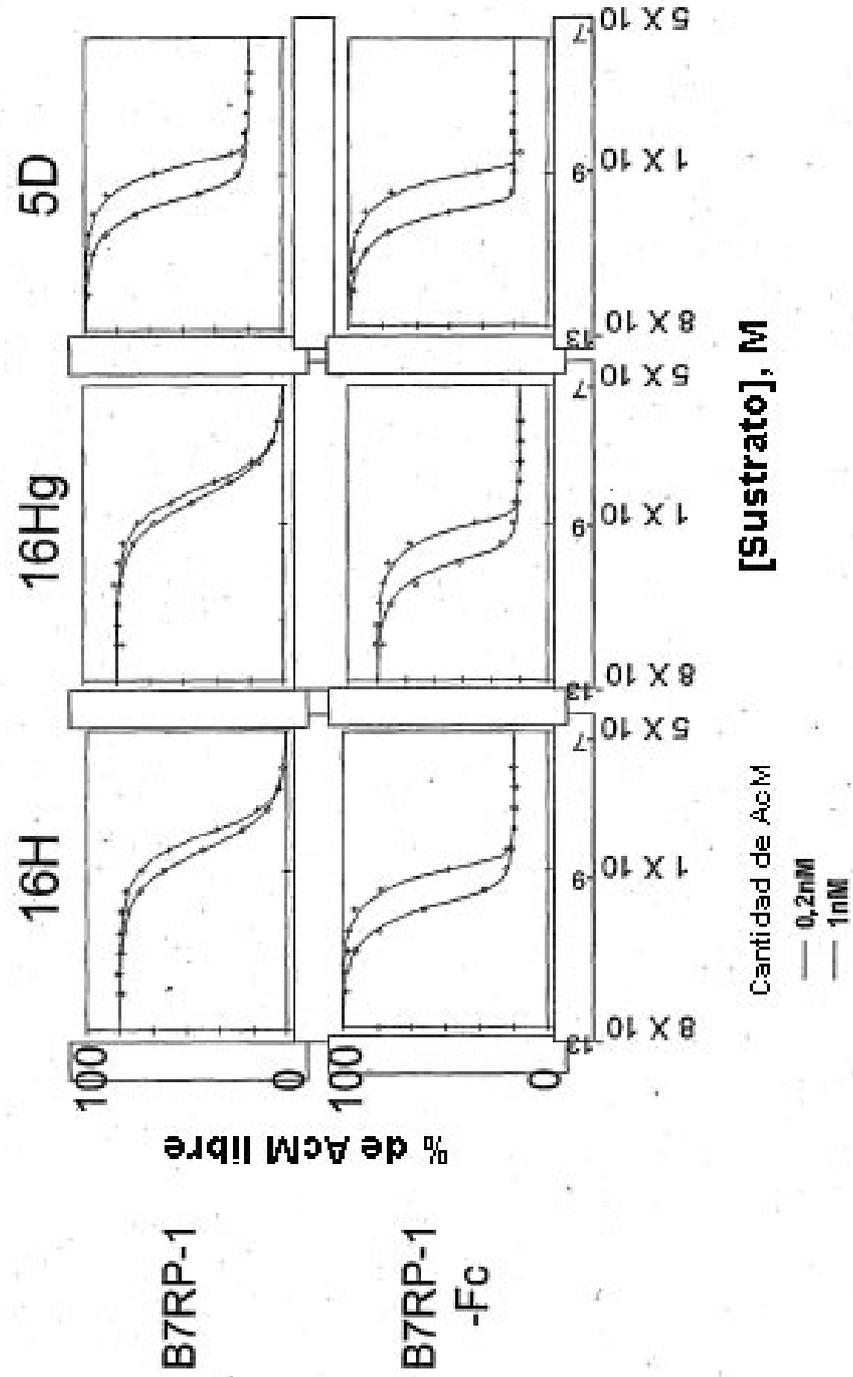


Figura 3

Anticuerpo anti-huB7RP1 5D frente a HuB7RP1

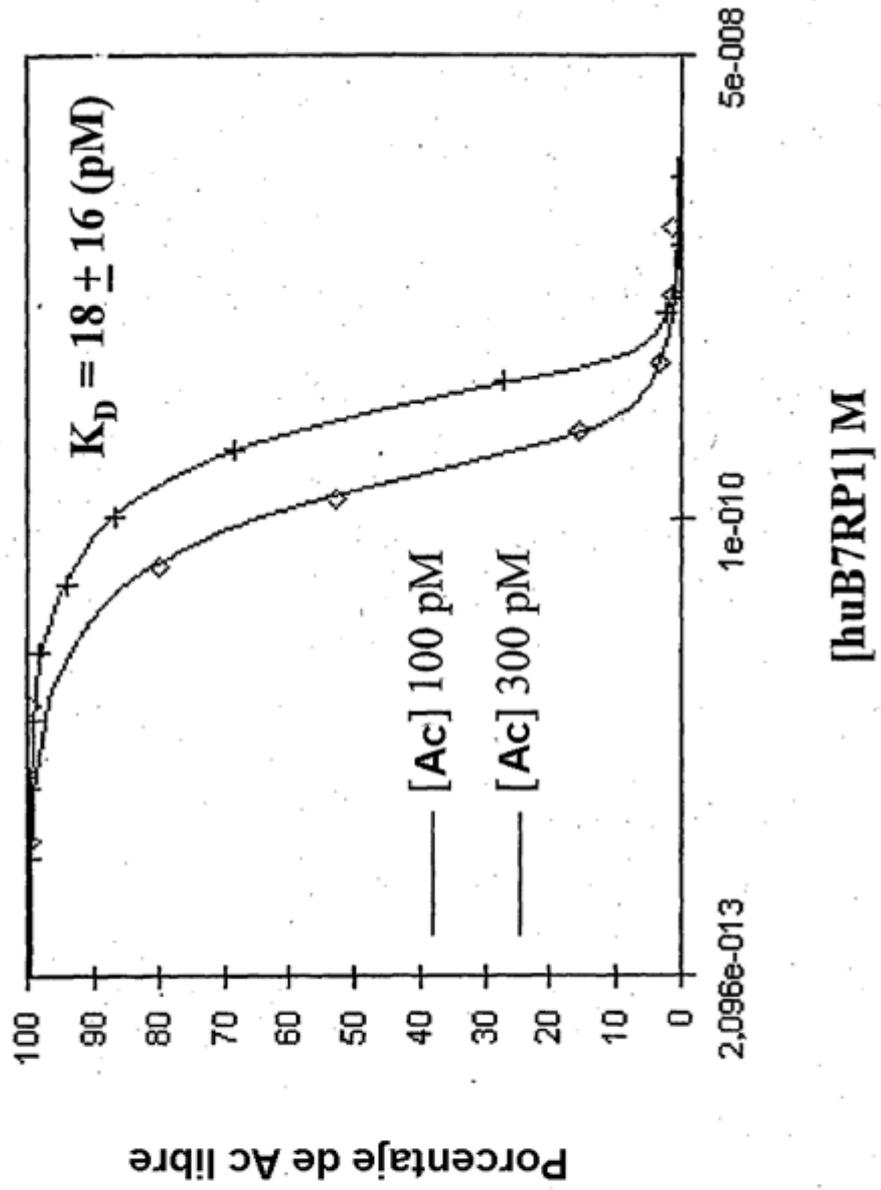
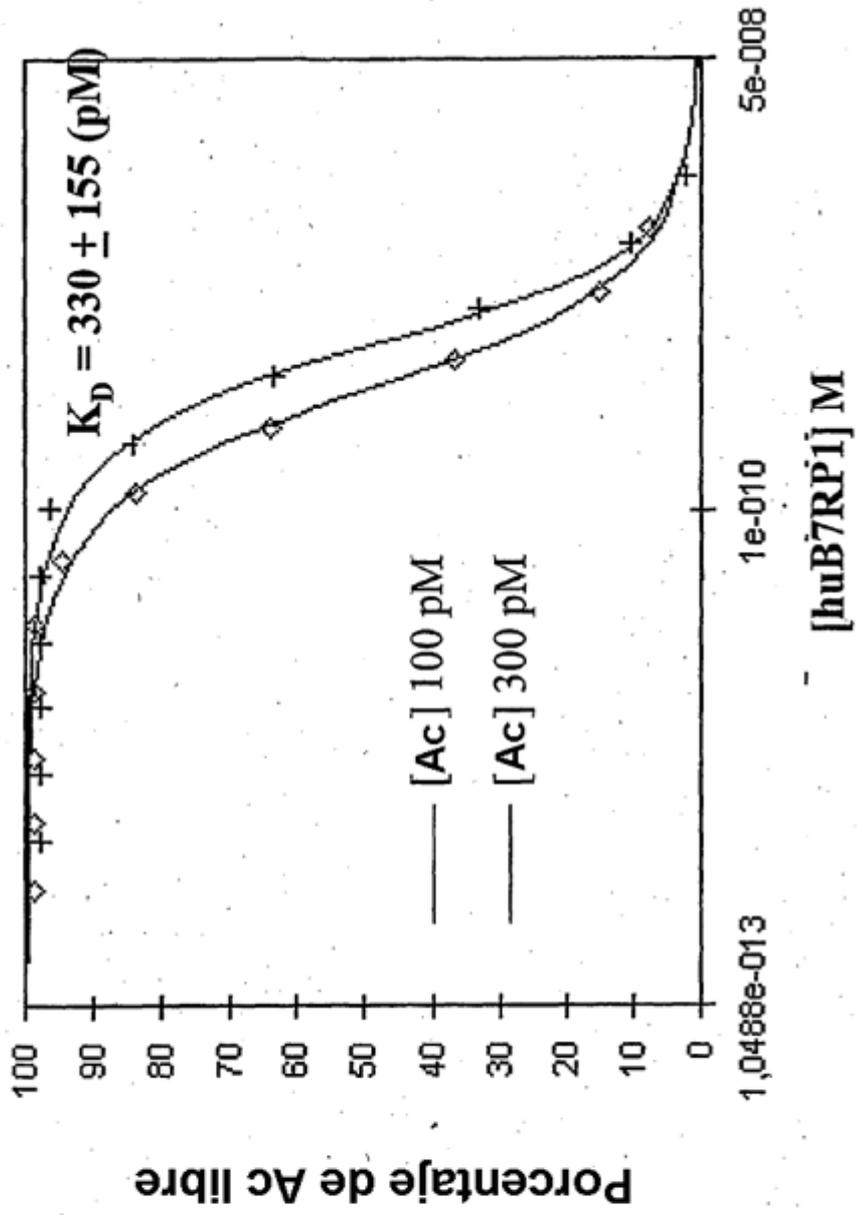


Figura 4

Anticuerpo anti-huB7RP1 2H frente a HuB7RP1



Anticuerpo anti-huB7RP1 2H (línea germinal)
frente a HuB7RP1

Figura 5

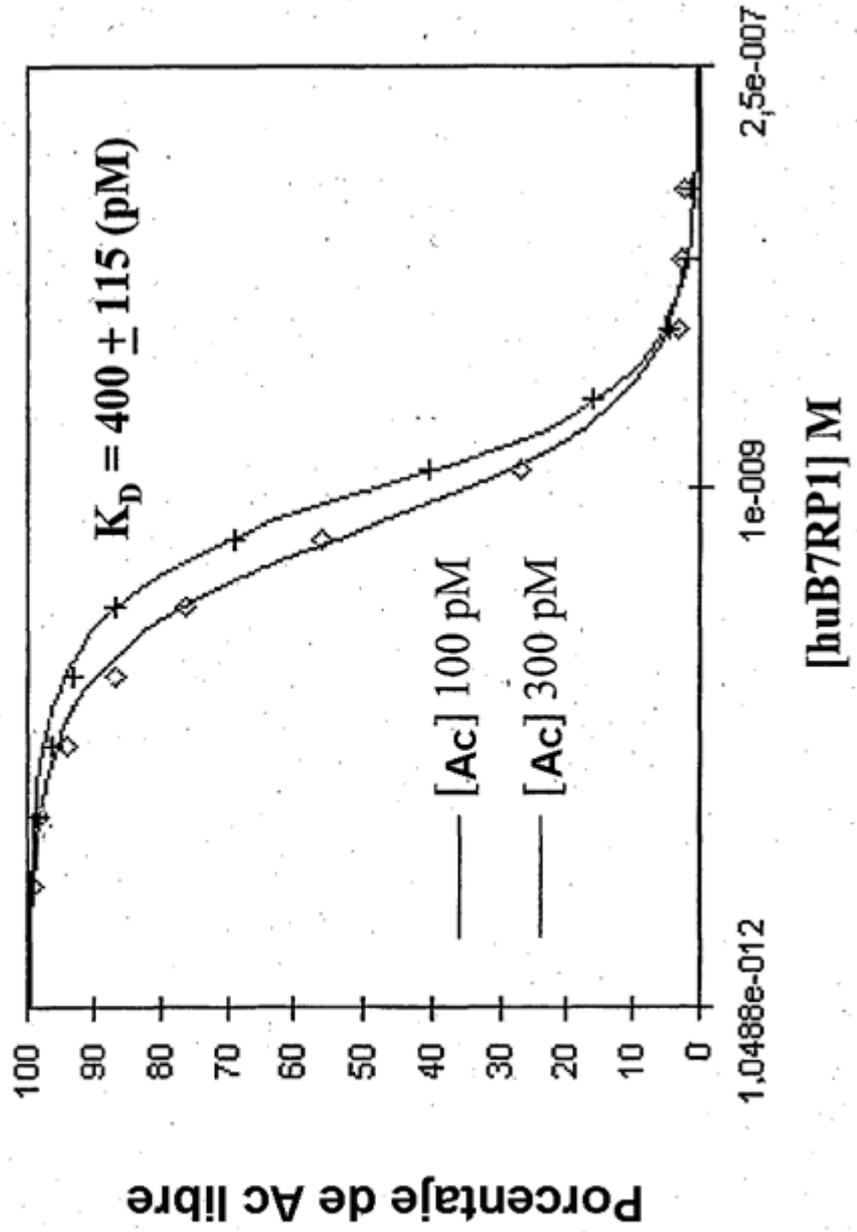


Figura 6

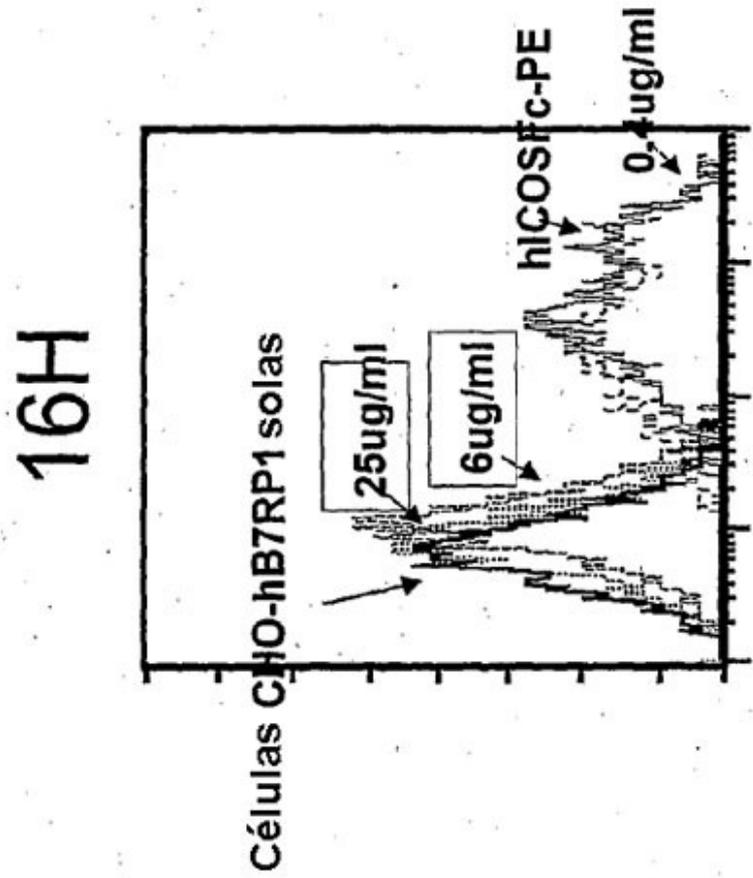


Figura 7

N.º de muestras secuenciadas	Ubicación en ADNc	Cambio de base	N.º de homocigotos	N.º de heterocigotos	Frecuencia alélica alterna	Cambio de aa	Ubicación en secuencia de péptidos
70	22	G→C	4	31	27,9%	L→V	8 (pep. señal)
70	31	G→T	6	48	42,9%	L→M	11 (pep. señal)
88	382	G→A	5	40	28,4%	V→I	128 (de tipo IgV)
1.5	661	T→C	?	?	?	L→F	221 (de tipo IgC)

* Número de individuos. El número de cromosomas es dos veces esta cantidad.

Figura 8

AcM	CI50
33H	8,3
34H	14,4
38H	8,6
39H	12,6
41H	5,9
43H	8,0
44H	9,2
45H	10,5
2K	17,0
3K	10,0
4K	15,1
5K	18,9
ICOS	9,5

AcM	CI50
2H	6,6
4H	9,3
6H	11,2
8H	8,8
10H	11,1
15H	8,2
16H	6,3
18H	12,7
21H	8,7
25H	12,6
31H	10,0
32H	11,6
ICOS	9,5

Figura 9

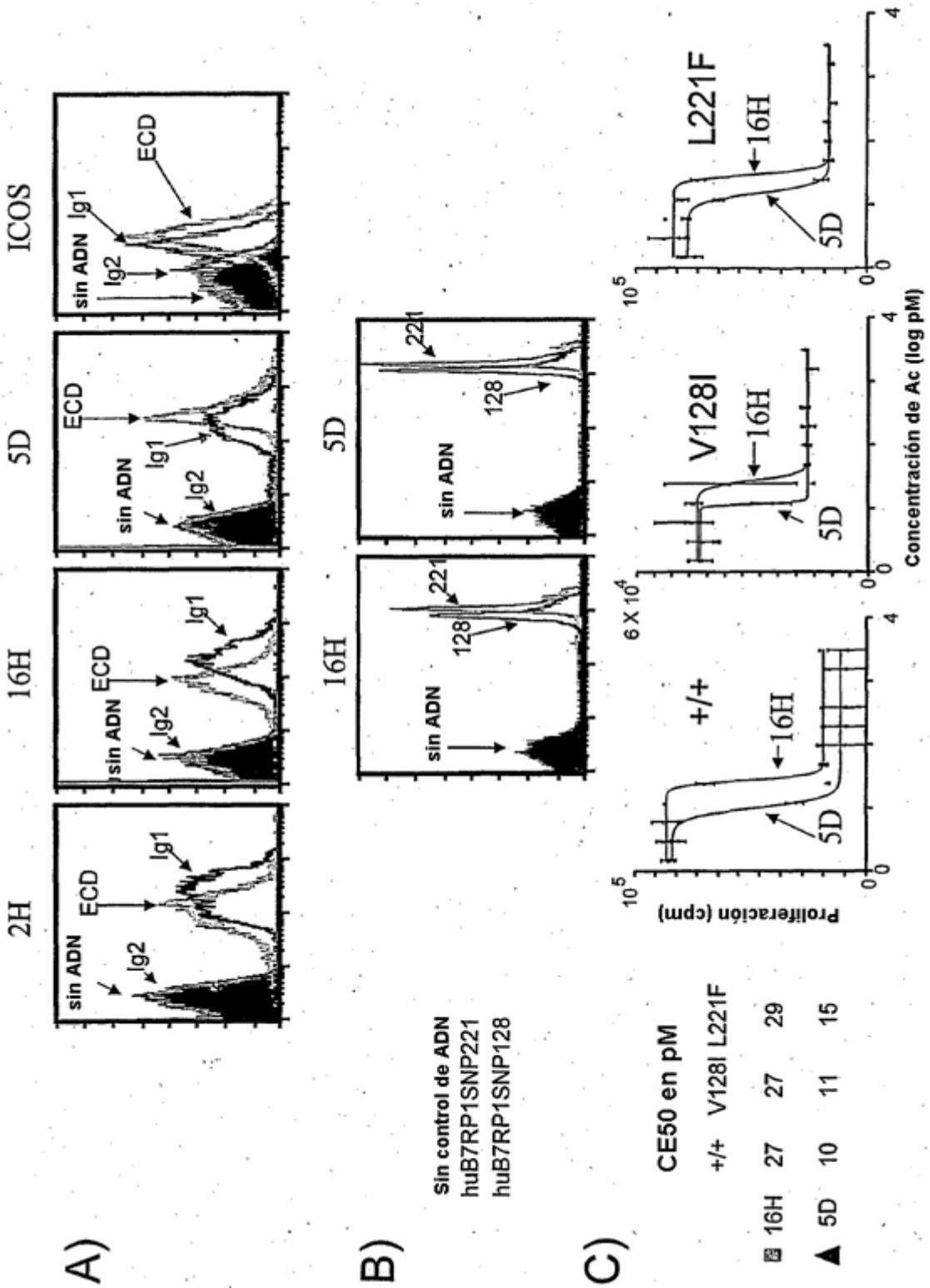


Figura 10A

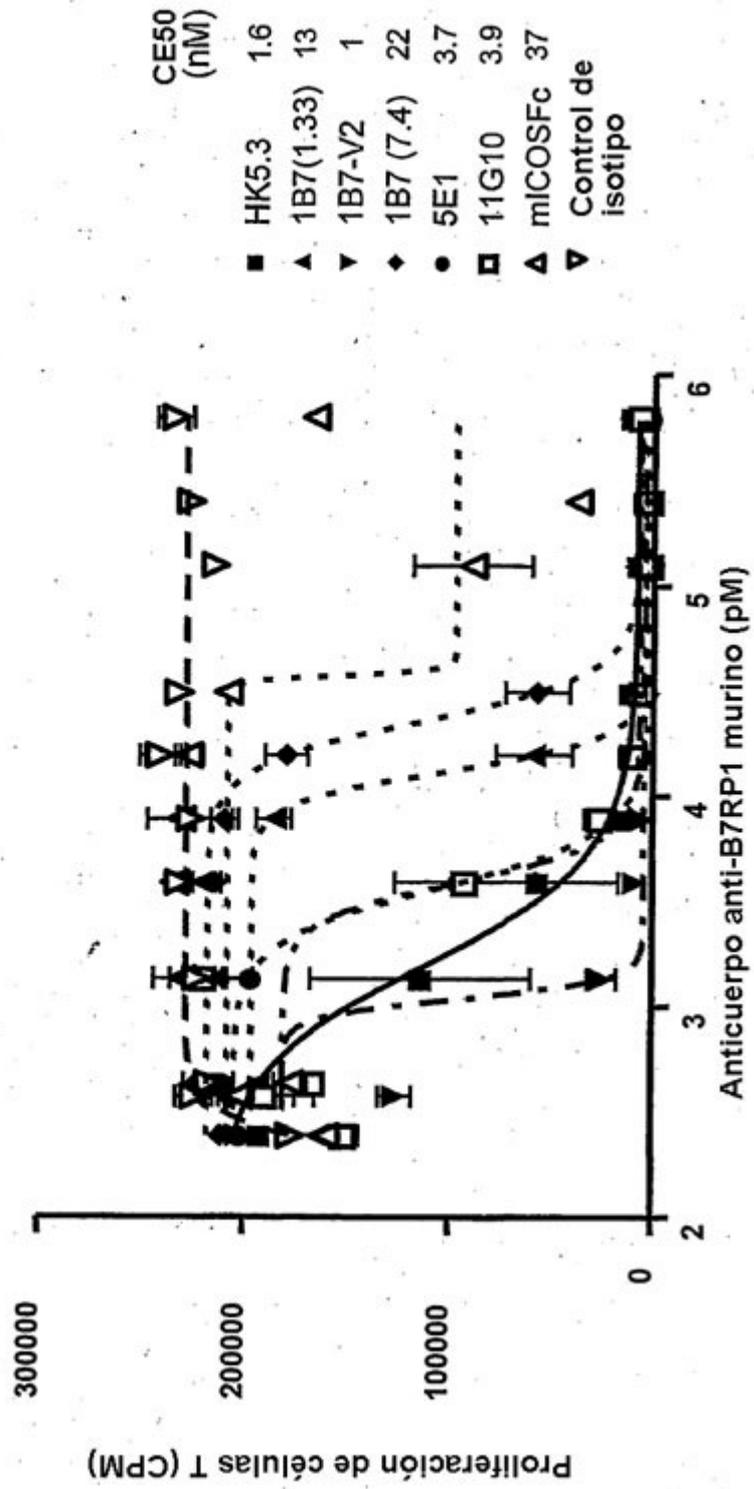


Figura 10B: IgM

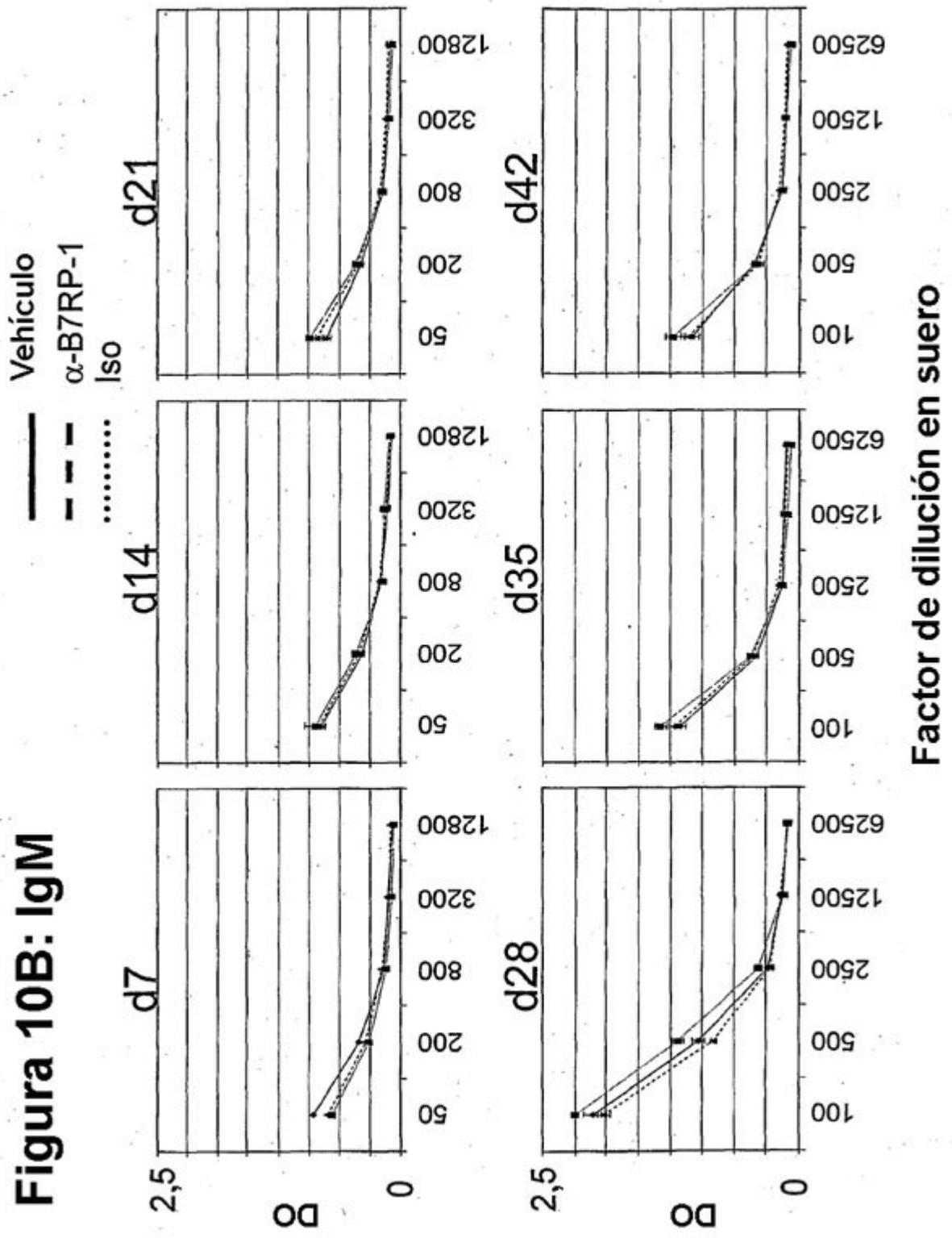


Figura 10D: IgG1

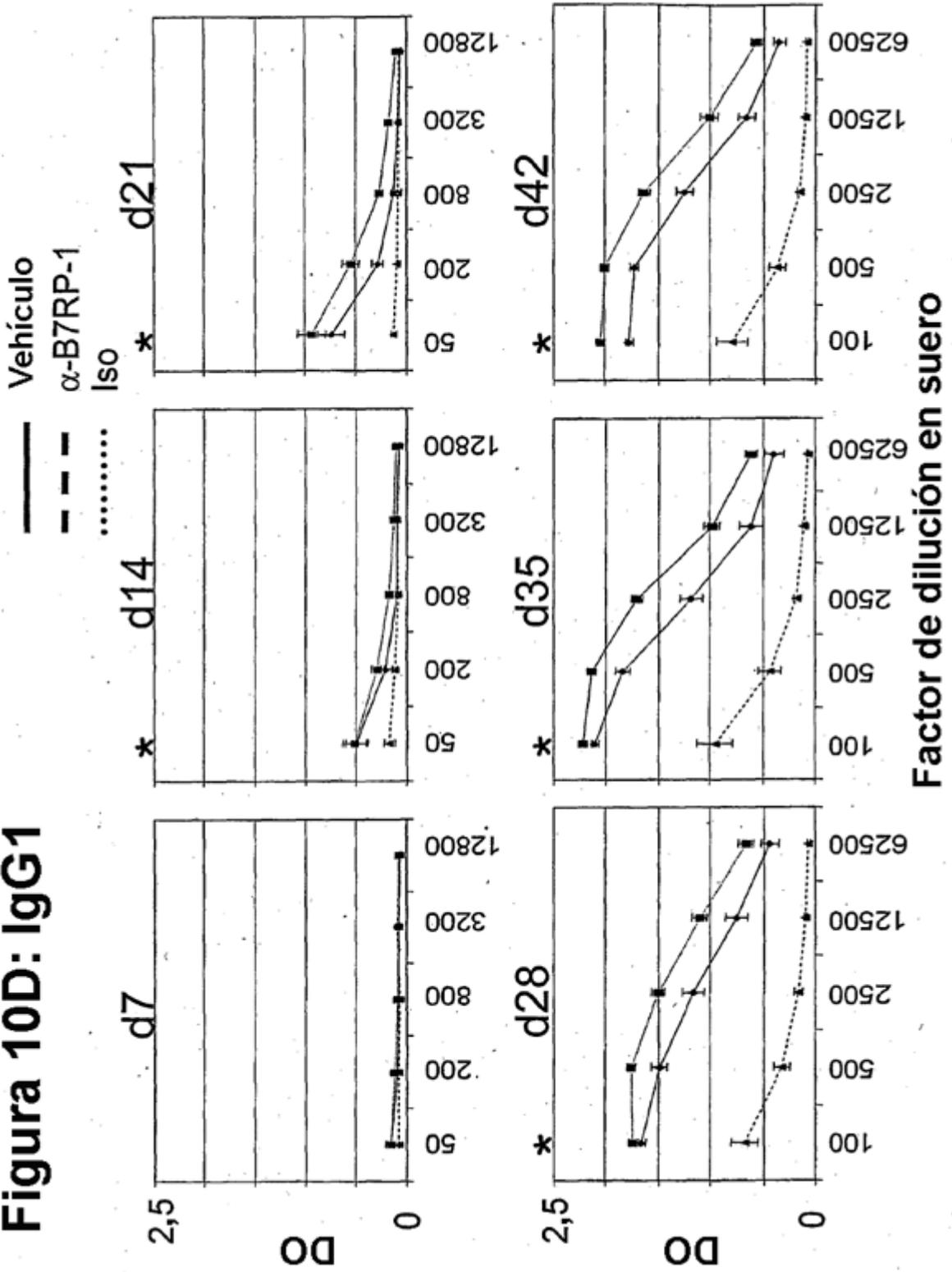


Figura 11

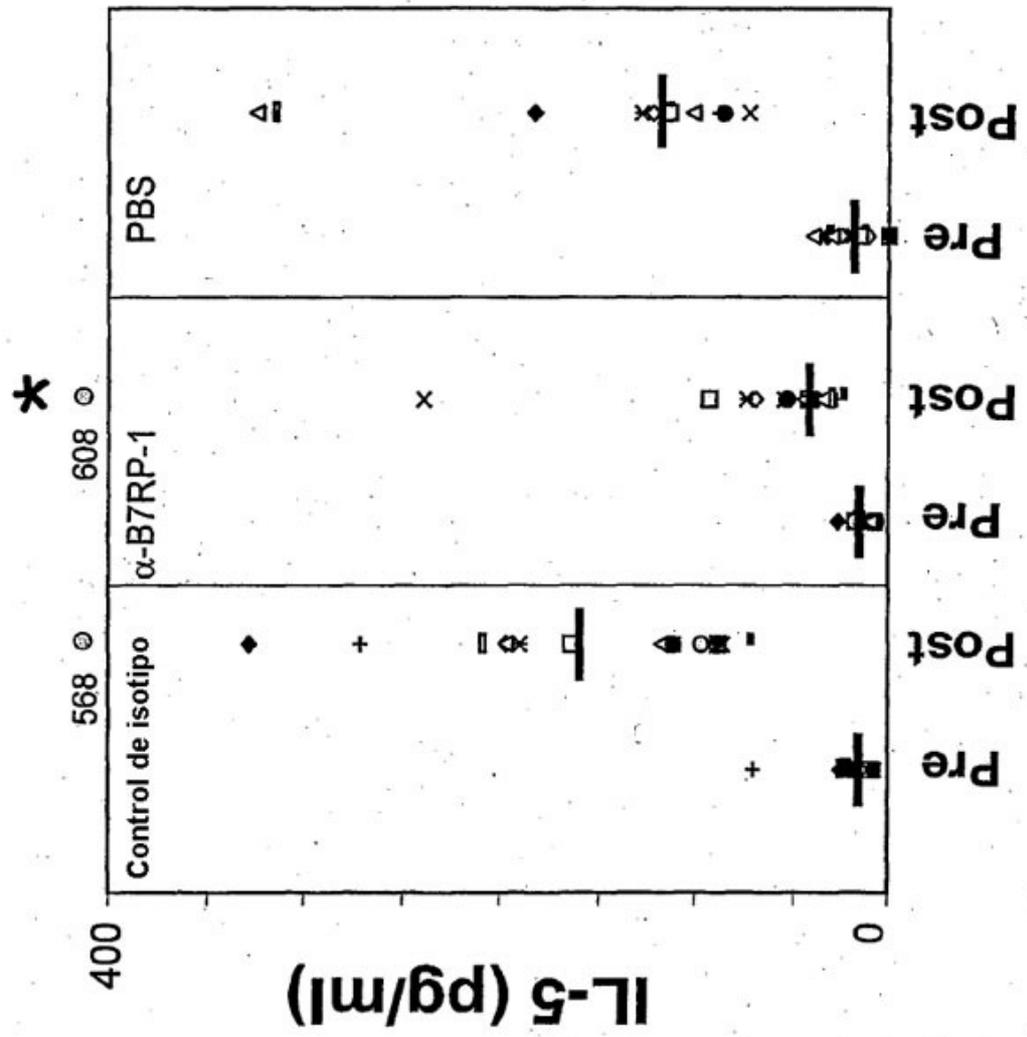


Figura 12

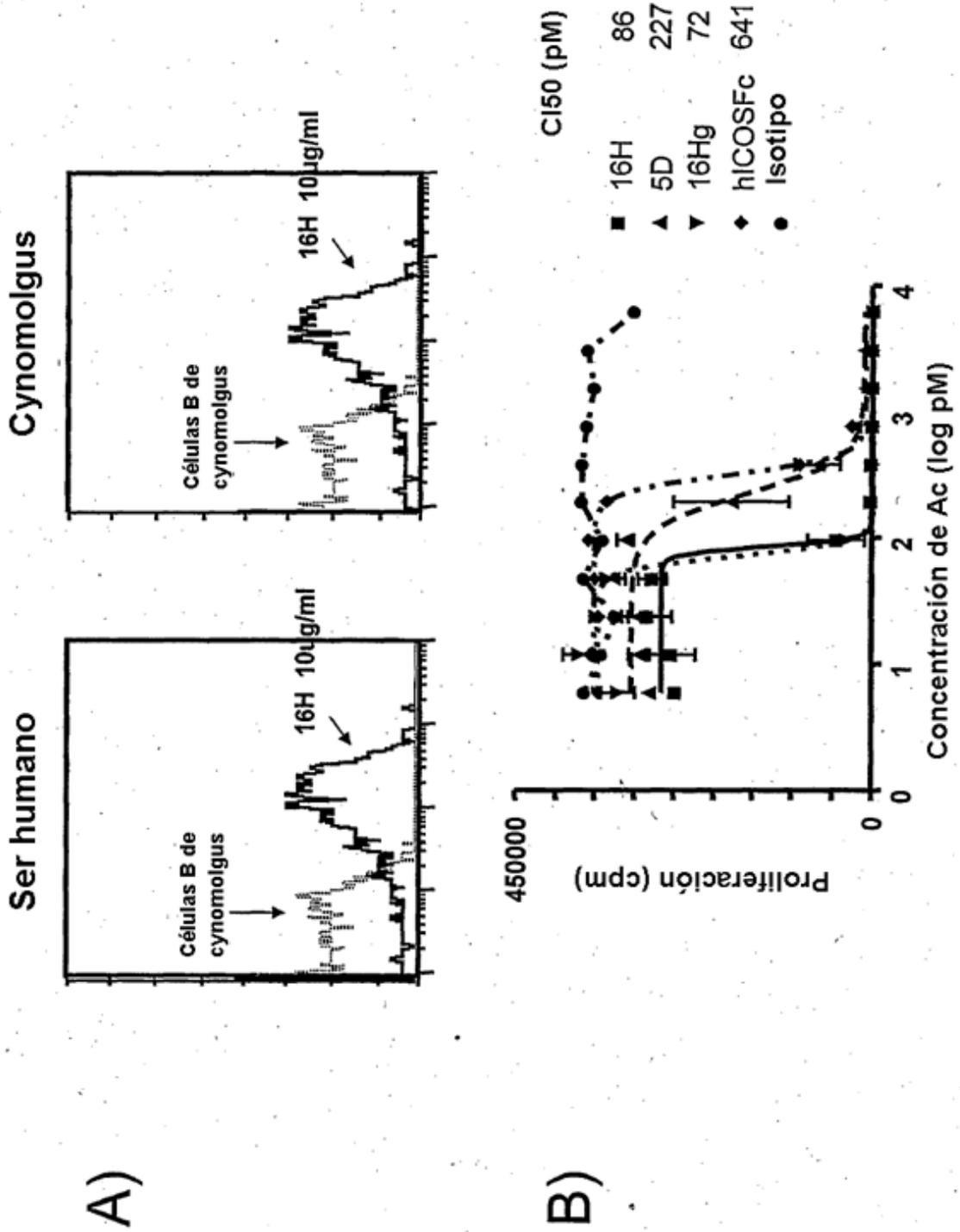


Figura 13A: 16H

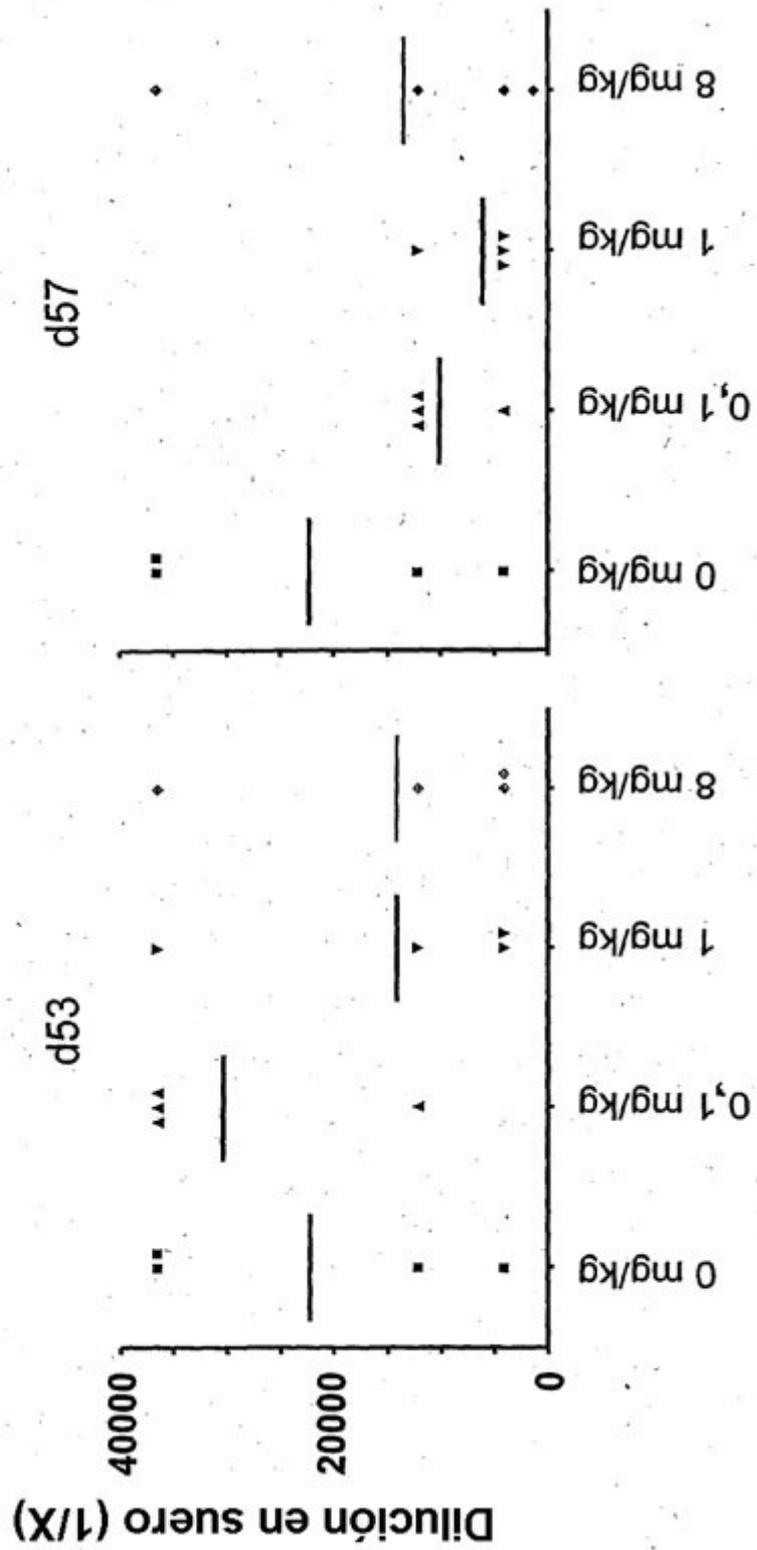


Figura 13B: 5D

