

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 117**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2009 PCT/US2009/004711**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO10021697**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2009 E 09789161 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2321351**

54 Título: **Anticuerpos anti-CCR2**

30 Prioridad:

18.08.2008 US 189357 P

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

08.03.2018

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (50.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US y
AMGEN FREMONT INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BELOUSKI, SHELLEY SIMS;
GREEN, LARRY L.;
LIANG, MEINA;
GLADUE, RONALD P.;
KELLER, BRADLEY T.;
OGAWA, SHINJI;
RAJPAL, ARVIND y
TYLASKA, LAURIE A.**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 658 117 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CCR2

REFERENCIA CRUZADA A PATENTES Y SOLICITUDES DE PATENTE RELACIONADAS

5

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 61/189.357, presentada el 18 de agosto de 2008.

ACUERDO DE INVESTIGACIÓN CONJUNTA

10

[0002] La descripción y las reivindicaciones en el presente documento se realizaron como resultado de las actividades emprendidas dentro del alcance de un acuerdo de investigación conjunta entre Pfizer Inc. y Abgenix Inc. que estaba en vigor en o antes de la fecha en la que se desarrolló la materia reivindicada.

15

ANTECEDENTES

[0003] Se cree que la infiltración de leucocitos en sitios inflamatorios es regulada por proteínas de 8-10 kD conocidas como quimioquinas. Estas quimioquinas se clasifican en cuatro grupos, dependiendo del espaciamiento de sus residuos de cisteína N-terminales, designados CC, CXC, XC y CX3C. Las quimioquinas pueden mediar en una variedad de efectos proinflamatorios sobre leucocitos, tales como desencadenamiento de quimiotaxis, desgranulación, síntesis de mediadores lipídicos y activación de integrina (Oppenheim, JJ et al, Annu Rev. Immunol., 9: 617-648 (1991); Baggiolini, M., et al, Adv Immunol., 55: 97-179 (1994); Miller, MD y Krangel, MS, Crit Rev. Immunol., 12: 17-46 (1992)).

20

[0004] Una quimioquina, proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), también conocida como CCL2, actúa sobre los monocitos, linfocitos y células dendríticas, para inducir la quimiotaxis, la liberación de gránulos, estallido respiratorio y la liberación de citoquinas. Los estudios han sugerido que la MCP-1 está implicada en la patología de enfermedades, tales como artritis reumatoide, aterosclerosis, enfermedades granulomatosas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), obesidad/diabetes, dolor neuropático, cáncer y esclerosis múltiple (Koch, J. Clin. Invest 90: 772-79 (1992); Hosaka et al, Clin Exp Immunol 97: 451-457 (1994); Schwartz et al, Am J. Cardiol 71 (6): 9B-14B (1993); Schimmer et al, J. Immunol 160: 1466-1471 (1998); Flory et al, Lab Invest. 69: 396-404 (1993); Gong et al, J. Exp. Med. 186: 131-137 (1997); Salcedo et al Blood 96 (1) 34-40 (2000); Bracke et al, Inflammation & Allergy - Drug Targets 6: 75-79 (2007); Chung Current Drug Targets - Inflammation & Allergy 4: 619-625 (2005)).

25

30

[0005] El CCR2 es un receptor quimiotáctico acoplado a proteína G de siete dominios transmembrana que se une a MCP-1, así como otras quimioquinas, incluyendo CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3) y CCL13 (MCP-4) (Charo, SI, et al, Proc Natl Acad Sci USA. 91: 2752-2756 (1994); Myers, SJ, et al, J. Biol Chem 270: 5.786-5.792 (1995); Gong et al., J. Biol Chem 272: 11682-11685 (1997); Garcia-Zepeda et al, J. Immunol. 157: 5613-5626 (1996)). CCR2 también es conocida como CMKBR2 y CKR2. Se han clonado dos formas cortadas y empalmadas alternativamente de CCR2, CCR2A y CCR2B que difieren en sus extremos C-terminales (Wong et al (1997) J. Biol Chem. 272: 1038-1045). En estudios de señalización, tanto CCR2A como CCR2B median en la movilización de calcio dependiente de agonista y la inhibición de adenilil ciclasa. El CCR2 se expresa en monocitos, células T y células dendríticas, e interacciona con quimioquinas secretadas por células endoteliales, monocitos y fibroblastos sinoviales.

35

40

[0006] El papel biológico de CCR2 se ha sondeado mediante el uso de ratones knockout de CCR2 (Boring et al, J Clin Invest 100 (10): 2552-61 (1997); Boring et al, Nature 394 (6696): 894-7 (1998); De Paolo et al, J Immunol 171 (7): 3560-7 (2003); Gaupp et al, Am J Pathol 162 (1): 139-50 (2003)). Los ratones CCR2 -/- tienen defectos significativos en respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado y la producción de citoquinas de tipo Th1, y son generalmente menos susceptibles al desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Además de la modulación de las respuestas inmunitarias, la CCR2 es un coreceptor para el VIH (Connor et al, J. Exp Med 185: 621-628 (1997); Frade et al, J Clin Invest 100 (3): 497-502 (1997)).

45

50

[0007] Debido a la participación de la MCP-1 y su receptor CCR2 en las respuestas inmunes indeseables, los antagonistas de CCR2 pueden ser agentes terapéuticos prometedores. Sin embargo, se han descrito pocos antagonistas de CCR2 (véase Ogilvie et al, Blood 97 (7): 1920-4 (2001)). Por lo tanto, hay una necesidad de nuevas y mejores composiciones que se unirán a CCR2 y bloquearán la señalización de CCR2 mediada por su ligando. WO 03/066830 describe anticuerpos monoclonales humanos contra proteínas de membrana. Ki Hoon Han et al. 1999, Journal of Biological Chemistry, vol. 274 (45): 32055-32062 describe el papel del primer bucle extracelular en la activación funcional de CCR2. Frade et al. 1997, Journal of Immunology, vol.159 (11): 5.576-5.584 describe la caracterización del receptor de quimioquina CCR2 y la expresión del receptor CCR2 funcional en células B.

55

60

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0008] La presente invención se define por las reivindicaciones. Aquellas realizaciones/aspectos de la divulgación que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

5 CARACTERÍSTICAS DE LA DESCRIPCION

[0009] Se proporcionan anticuerpos aislados, o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a CCR2, particularmente CCR2 humano, y pueden actuar como un antagonista de CCR2, y composiciones que comprenden dichos anticuerpos o partes. Se incluyen anticuerpos o partes de unión a antígeno que se unen a CCR2 en un epítipo distinto de la parte N-terminal o el tercer bucle de CCR2. Tales anticuerpos se pueden unir a los primeros y/o segundos bucles extracelulares de CCR2.

[0010] Se proporcionan composiciones que comprenden (i) la cadena pesada y/o ligera, los dominios variables de las mismas, o partes de unión a antígeno de los mismos, de dicho anticuerpo anti-CCR2, o moléculas de ácido nucleico que las codifican; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden comprender adicionalmente otro componente, tal como un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

[0011] También se proporcionan procedimientos de diagnóstico y terapéuticos. Del mismo modo, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 y partes de los mismos para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de trastornos inflamatorios y no inflamatorios.

[0012] Se proporcionan vectores y células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico, así como procedimientos para producir de forma recombinante los polipéptidos codificados por las moléculas de ácidos nucleicos. También se proporcionan líneas celulares aisladas que producen un anticuerpo anti-CCR2 o una parte de unión a antígeno del mismo.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0013]
 Las Figuras 1A, 1B y 1C son gráficos que muestran la unión de un anticuerpo de CCR2 a las células, tal como se ensaya mediante análisis de FACS. La figura 1A es un gráfico que ilustra la unión del anticuerpo de CCR2 4.40 A68G S230P conjugado a AF-488 (ALEXA FLUOR® 488, Invitrogen) a monocitos de sangre entera humana en comparación con un anticuerpo de control KLH, tal como se ensaya mediante análisis de FACS. La Figura 1B es un gráfico que ilustra la unión del anticuerpo de CCR2 4.40 A68G S230P conjugado a AF-488 a células 300-19 que expresan CCR2 humano, tal como se ensaya mediante análisis de FACS. La Figura 1C es un gráfico que ilustra la unión de diferentes concentraciones de anticuerpo 4.40 A68G S230P a células 300-19 transfectadas con CCR2, tal como se detecta con PE anti-humano. La figura 2 ilustra la unión relacionada con la dosis de anticuerpo 4.40 A68G S230P a células 300-19 transfectadas con CCR2 en un ensayo de unión de saturación.

La Figura 3 ilustra la capacidad del anticuerpo 4.40 A68G S230P para inhibir la quimiotaxis de células THP-1 en respuesta al ligando de CCR2 MCP-1, pero no en respuesta al ligando de CCR1/CCR5 MIP-1a.

La figura 4 ilustra la capacidad del anticuerpo 4.40 A68G S230P para inhibir la quimiotaxis de monocitos humanos primarios en respuesta a MCP-1.

La figura 5 muestra el mapa del plásmido de un vector retroviral para la expresión de las quimeras CCR1/CCR2.

Las figuras 6A y 6B ilustran la unión del anticuerpo 4.40 A68G S230P a células 300-19 que expresan un receptor quimérico que consiste en sólo el 1er y 2º bucles extracelulares de CCR2 y el extremo N terminal y el tercer bucle de CCR1. La Figura 6C representa un ensayo de unión por saturación de 4.40 A68G S230P al células 300-19 transfectadas con receptor quimérico tal como se mide por análisis de FACS.

La figura 7 muestra el análisis de unión por saturación (curva de saturación de 3 horas) del anticuerpo 4.40 A68G S230P en (A) células 300-19 de control; (B) células 300-19 transfectadas que expresan CCR2 de longitud completa; (C) células 300-19 transfectadas que expresan la quimera MRRR (M1) etiquetada con flag [N terminal de CCR2 (M) etiquetada con flag para asegurar la expresión del receptor y las regiones de bucle de CCR1 (R)]; (D) células 300-19 transfectadas que expresan la quimera RRRM (M1) etiquetada con flag [N terminal y 1er y 2º bucle de CCR1 (R) etiquetado con flag para asegurar la expresión del receptor y el 3er bucle de CCR2 (M)]; y (E) células 300-19 transfectadas que expresan la quimera RMMR (M1) etiquetada con flag [N terminal y el tercer bucle de CCR1 (R) etiquetado con flag para asegurar la expresión del receptor y el 1er y 2º bucle de CCR2 (M)].

La figura 8 muestra la unión del anticuerpo 4.40 A68G S230P a cualquiera de las regiones de péptido del bucle 2 o bucle 3 de CCR2 como se evalúa en un ELISA de captura.

La figura 9 muestra dos gráficos que ilustran la inmunotinción de FACS de células 300-19 que expresan CCR5 recombinante, ya sea con el anticuerpo 4.40.3 A68G S230P conjugado a AF-488 (panel A) o con un anticuerpo anti-CCR5 (panel B).

La figura 10 ilustra la inhibición de la actividad inducida por MCP-1 por el anticuerpo 4.40 A68G S230P según la evaluación de la movilización de calcio en células 300-19 transfectadas con CCR2.

La figura 11 demuestra la inhibición de quimiotaxis inducida por MCP-3 de células 300-19 transfectadas con CCR2 por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

5 La figura 12 ilustra la inhibición de la polimerización de actina de monocitos humanos en respuesta a MCP-1 en sangre entera por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

La figura 13 ilustra la inhibición de la polimerización de actina de monocitos en respuesta de mono cynomolgus hembra a MCP-1 en sangre entera por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

10 La figura 14 muestra la inhibición dependiente de la dosis de la síntesis de ARNm de colágeno 1 en la línea celular hHSC, LI90, por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

La figura 15 demuestra la inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de pERK en sangre entera humana a 10 nM de MCP-1 por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

15 La figura 16 muestra la disminución de las actividades de alanina transaminasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en plasma en ratones knock-in de CCR2 humano por el anticuerpo 4.40 A68G S230P 24 horas después de una sola inyección de ConA.

Las Figuras 17A-17D muestran una alineación de las secuencias de aminoácido de la línea germinal de las regiones variables de cadena pesada y ligera en comparación con las respectivas regiones de cadena pesada y ligera de los anticuerpos 4.22.3, 4.40.2, 4.39.3 y 4.9.2 (sólo se muestran desapareamientos para los anticuerpos 4.22.3, 4.40.2, 4.39.3 y 4.9.2). Las CDR están subrayados y los huecos desapareados se indican con un signo (#).

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DESCRIPCIÓN

Definiciones y técnicas generales

25 **[0014]** A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos en la técnica. Además, a menos que se requiera de otra manera por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. En general, la nomenclatura utilizada en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química de proteínas y ácidos nucleicos, e hibridación descrita en el presente documento son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones, prevalecerá.

35 **[0015]** Los procedimientos y técnicas se realizan generalmente según procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989); Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Associates Publishing (1992); y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1990). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, como comúnmente se realiza en la técnica o como se describe en el presente documento. La nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descrita en el presente documento son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y liberación, y tratamiento de pacientes.

45

[0016] Los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que tienen los siguientes significados:

[0017] El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

50

[0018] El término "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" es una proteína, polipéptido o anticuerpo que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociado con componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente estará "aislado" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también resultará sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en el sector.

55

[0019] Los ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo anti-CCR2 que ha sido purificado por afinidad utilizando CCR2 o una parte del mismo, un anticuerpo anti-CCR2 que se ha sintetizado por un hibridoma u otra línea celular in vitro, y un anticuerpo anti-CCR2 humano derivado de un ratón transgénico.

60

[0020] Una proteína o polipéptido es "sustancialmente puro", "sustancialmente homogéneo" o "sustancialmente purificado" cuando al menos aproximadamente 60 a 75% de una muestra exhibe una única especie de polipéptido. El polipéptido o proteína puede ser monomérica o multimérica. Un polipéptido o proteína sustancialmente puros típicamente comprenden aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% p/p de una muestra de proteína, más usualmente aproximadamente 95%, y puede ser más del 99% puros. La pureza o la homogeneidad de la proteína pueden indicarse por un número de medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de visualización de una única banda de polipéptido tras la tinción del gel con una tinción bien conocida en la técnica. Para ciertos propósitos, se puede proporcionar una mayor resolución mediante el uso de HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para la purificación.

[0021] El término "análogo de anticuerpo" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que comprende un segmento que tiene una identidad sustancial con una parte de una secuencia de aminoácidos y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a CCR2 bajo condiciones de unión adecuadas, (2) capacidad para inhibir al menos una actividad biológica de CCR2. Típicamente, los análogos de anticuerpo comprenden una sustitución de aminoácidos conservativa (o inserción o delección) con respecto a la secuencia nativa. Los análogos típicamente tienen al menos 20 o 25 aminoácidos de longitud, al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud o más, y a menudo pueden ser tan largos como cadenas pesadas o cadenas de longitud completa de los anticuerpos. Algunos casos incluyen análogos de anticuerpos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 sustituciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal.

[0022] En ciertos casos, las sustituciones de aminoácidos a un anticuerpo anti-CCR2 o parte de unión a antígeno del mismo son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para la formación de complejos de proteínas, (4) añaden o eliminan sitios de glicosilación y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos, pero todavía conservan la unión específica a CCR2. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica normalmente de origen. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas, en la secuencia normalmente de origen en una parte del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental; por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debe alterar la lámina beta anti-paralela que constituye el dominio de unión a inmunoglobulina que se produce en la secuencia original, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia parental. En general, la glicina y la prolina no se utilizarían en una lámina beta anti-paralela. Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed, WH Freeman and Company, New York (1984).); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds, Garland Publishing, Nueva York, Nueva York (1991).); y Thornton et al, *Nature* 354: 105 (1991).

[0023] Cuando se refiere un "anticuerpo" en el presente documento, se entiende normalmente que una parte de unión a antígeno del mismo también se puede utilizar. Una parte de unión al antígeno compete con el anticuerpo intacto por la unión específica. Véase, en general, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., Segunda ed., Raven Press, Nueva York (1989)). Las partes de unión a antígeno pueden producirse por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. En algunos casos, las partes de unión a antígeno incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, y región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena única (por ejemplo, scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una parte de un anticuerpo que es suficiente para conferir unión específica al antígeno a los polipéptidos.

[0024] De N-terminal a C-terminal, los dominios variables de cadena ligera y pesada maduros de un anticuerpo comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio en el presente documento es de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md (1987 y 1991).); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); o Chothia et al, *Nature* 342: 878-883 (1989).

[0025] Como se usa en el presente documento, un anticuerpo al que se hace referencia por número es el mismo que un anticuerpo monoclonal que se obtiene a partir del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 4.40 es el mismo anticuerpo que obtenido a partir del hibridoma 4.40, o un subclón del mismo. Los subclones secuenciales se designan por ejemplo 4.40.1, 4.40.2, 4.40.3 y, y tienen sustancialmente las mismas secuencias y funcionalidad.

[0026] Como se usa en el presente documento, un fragmento Fd significa un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; un fragmento Fv consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward et al, *Nature* 341: 544-546 (1989)) consiste en un dominio V_H.

[0027] En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única (por ejemplo, scFv) en los que los dominios V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes a través de un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena polipeptídica. (Véase, por ejemplo, Bird et al, Science 242: 423-426 (1988) y Huston et al, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-5883 (1988)). En algunos casos, los anticuerpos son diacuerpos, es decir, son anticuerpos bivalentes en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno. (Véase, por ejemplo, Holliger P. et al, Proc Natl Acad Sci USA. 90: 6444-6448 (1993), y Poljak RJ et al, Structure 2: 1121-1123 (1994)). En algunos de los casos, una o más CDR de un anticuerpo en el presente documento se pueden incorporar en una molécula ya sea covalentemente o no covalentemente para que sea una inmunoadhesina que se une específicamente a CCR2. En tales casos, la CDR o las CDR se pueden incorporar como parte de una cadena polipeptídica más grande, pueden unirse covalentemente a otra cadena polipeptídica, o pueden incorporarse de forma no covalente. En los casos en que tienen uno o más sitios de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes.

[0028] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo humano" significa cualquier anticuerpo en el que las secuencias de dominio variable y constante son secuencias humanas. El término abarca anticuerpos con secuencias derivadas de genes humanos, pero que se han cambiado, por ejemplo, para disminuir la posible inmunogenicidad, aumentar la afinidad, eliminar cisteínas que podrían causar un plegamiento indeseable, etc. El término abarca dichos anticuerpos producidos de forma recombinante en células no humanas, lo que podría impartir la glicosilación no típica de las células humanas. Estos anticuerpos se pueden preparar en una variedad de maneras, tal como se describe en el presente documento.

[0029] El término "anticuerpo quimérico" como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que comprende regiones de dos o más anticuerpos diferentes. En un caso, una o más de las CDR del anticuerpo quimérico se derivan de un anticuerpo anti-CCR2 humano. En otro caso, todas las CDR se derivan de anticuerpos anti-CCR2 humanos. En otro caso, las CDR de más de un anticuerpo anti-CCR2 humano se combinan en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo anti-CCR2 humano, una CDR2 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo anti-CCR2 humano y una CDR3 de la cadena ligera de un tercer anticuerpo anti-CCR2 humano, y CDR de la cadena pesada pueden derivar de uno o más anticuerpos anti-CCR2. Además, las regiones armazón pueden derivar de uno de los anticuerpos anti-CCR2 de las que una o más de las CDR se toman de uno o más anticuerpos humanos diferentes.

[0030] En algunos casos, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo anti-CCR2 humanizado. Un anticuerpo anti-CCR2 humanizado comprende la secuencia de aminoácidos de una o más regiones armazón y/o la secuencia de aminoácidos de al menos una parte de la región constante de una o más anticuerpos anti-CCR2 humanos y CDR derivadas de un anticuerpo anti-CCR2 no humano.

[0031] Los fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina pueden prepararse fácilmente por los expertos en la técnica siguiendo las enseñanzas de esta memoria. Los extremos amino y carboxilo terminales preferidos de los fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de dominios funcionales.

[0032] El término "resonancia de plasmón superficial", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo usando el sistema BIACORE® (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jonsson U. et al, Ann Biol Clin 51: 19-26 (1993); Jonsson U. et al, Biotechniques 11: 620-627 (1991); Jonsson B. et al, J. Mol Recognit 8: 125-131 (1995); y Johnsson B. et al, Anal Biochem 198: 268-277 (1991).

[0033] El término " K_D " se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Un anticuerpo se dice que se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es ≤ 1 mM, ≤ 100 nM, o ≤ 10 nM. En ciertos casos, la K_D es de 1 pM a 500 pM. En otros casos, la K_D está entre 500 pM y 1 μ M, 1 μ M y 100 nM, o 100 mM y 10 nM.

[0034] El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T o de otra manera interactuar con una molécula específica. Los determinantes epitópicos consisten generalmente en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o hidratos de carbono o cadenas laterales de azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítipo puede ser "lineal" o "conformacional". En un epítipo lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula que interactúa (tal como un anticuerpo) tienen lugar linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítipo conformacional, los puntos de interacción se producen a través de residuos de aminoácidos en la proteína que

están separados uno de otro. Una vez que se determina un epítipo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos frente a ese epítipo, por ejemplo, usando las técnicas descritas en la presente memoria descriptiva. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos pueden elucidar información acerca de epítipos deseables. A partir de esta información, es posible entonces detectar anticuerpos competitivos para la unión al mismo epítipo. Un enfoque para lograr esto es llevar a cabo estudios de competición y competición cruzada para encontrar anticuerpos que compiten o compiten de forma cruzada entre sí por la unión a CCR2, por ejemplo, los anticuerpos compiten por la unión al antígeno. Un proceso de alto rendimiento para "binning" (clasificar) anticuerpos en base a su competición cruzada se describe en la solicitud de Patente Internacional N° WO 03/48731.

[0035] Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver *Immunology – A Synthesis* (Segunda edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds, Sinauer Associates, Sunderland, Mass (1991)).

[0036] El término "polinucleótido" se refiere en el presente documento a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de cadena sencilla y doble.

[0037] El término "polinucleótido aislado" como se usa en el presente documento significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, 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 se encuentra el "polinucleótido aislado" en la naturaleza, (2) está unido operativamente 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.

[0038] El término "nucleótidos de origen natural" como se usa en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" como se usa en el presente documento incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" referidos en el presente documento incluye enlaces de oligonucleótidos, tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilatioato, fosforaniladato, fosforoamidato, y similares. Véase por ejemplo, LaPlanche et al., *Nucl. Acids Res.* 14: 9081 (1986); Stec et al., *J. Am. Chem. Soc.* 106: 6077 (1984); Stein et al., *Nucl. Acids Res.* 16: 3209 (1988); Zon et al, *Anti-Cancer Drug Design* 6: 539 (1991); Zon et al, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp 87-108 (F. Eckstein, Ed, Oxford University Press, Oxford England (1991)); Patente de Estados Unidos No. 5.151.510; Uhlmann y Peyman, *Chemical Reviews* 90: 543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección, si se desea.

[0039] Las secuencias "unidas operativamente" incluyen tanto secuencias de control de expresión que son contiguas con el gen de interés como las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión" como se usa en el presente documento significa secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como las señales de empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de traducción (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desean, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosomal, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotes, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

[0040] El término "vector", como se usa en el presente documento, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunos casos, el vector es un plásmido, es decir, una pieza de doble cadena circular de ADN en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. En algunos casos, el vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. En algunos casos, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). En otros casos, los vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

5 **[0041]** El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en el presente documento significa una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que "célula huésped recombinante" y "célula huésped" significa no sólo la célula objeto particular, sino también la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a una mutación o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún así se incluye dentro del alcance de la expresión "célula huésped", tal como se usa en el presente documento.

10 **[0042]** El término "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de secuencias de nucleótidos significa los residuos en dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima. Hay un número de diferentes algoritmos conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden compararse usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en Wisconsin Package Versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, proporcionan alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods. Mol Biol* 132: 185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol*. 266: 227-258 (1996); Pearson, *J. mol Biol*. 276: 71-84 (1998)). A menos que se especifique lo contrario, se utilizan los parámetros por defecto para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de nucleótidos puede determinarse usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o usando Gap con sus parámetros por defecto como se proporciona en GCG Versión 6.1.

25 **[0043]** Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca su complemento a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse que abarca su hebra complementaria, con su secuencia complementaria.

[0044] Como se usa en el presente documento, los términos "porcentaje de identidad de secuencia" y "porcentaje de homología de secuencia" se utilizan indistintamente.

30 **[0045]** El término "similitud sustancial" o "similitud de secuencia sustancial", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo significa que cuando se alinean óptimamente con las inserciones o deleciones de nucleótidos apropiados con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay de identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, y al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases nucleotídicas, medida mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, tal como se describió anteriormente.

35 **[0046]** Como se aplica a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT usando valores hueco por defecto tal como se suministra con los programas, comparten al menos 70%, 75% o 80% de identidad de secuencia, al menos 90% o 95% de identidad de secuencia, y al menos 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia. En ciertos casos, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren mediante sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243: 307-31 (1994). Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Grupos de aminoácidos de sustitución conservativa son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina.

55 **[0047]** Como alternativa, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet et al, *Science* 256: 1443-1445 (1992). Un reemplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

60 **[0048]** La identidad de secuencia para polipéptidos se mide típicamente usando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas empareja secuencias usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones,

deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que se pueden utilizar con los parámetros por defecto como se especifica por los programas para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y una mutante de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1 (Universidad de Wisconsin, WI). Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA usando parámetros por defecto o recomendados, véase GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol Biol* 132: 185-219 (2000)). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando parámetros por defecto tal como se suministra con los programas. Véase, por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402 (1997).

[0049] CCR2 es una proteína de siete dominios transmembrana, y por lo tanto tiene seis bucles. Los bucles 1, 3 y 5, a contar desde el N-terminal extracelular, son bucles intracelulares, mientras que los bucles 2, 4 y 6 son extracelulares. El primer, segundo y tercer bucles extracelulares de CCR2 se refieren a los bucles 2, 4 y 6, respectivamente.

[0050] A lo largo de esta memoria descriptiva y reivindicaciones, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

Anticuerpos anti-CCR2 humanos y su caracterización

[0051] En algunos casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 humanos se producen mediante la inmunización de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un roedor, cuyo genoma comprende genes de inmunoglobulina humana de manera que el animal transgénico produce anticuerpos humanos. En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 y partes de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos o partes de unión a antígeno (i) que se unen al primera o segundo bucle extracelular de CCR2, o ambos; (ii) que no se unen al extremo N-terminal o el tercer bucle extracelular de CCR2 o ambos; o (iii) que hacen ambos (i) y (ii). En otro caso, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 humanos que se unen a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 129: o SEQ ID NO: 128. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 humanos se unen a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos el 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO: 128 o la SEQ ID NO: 129. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 y partes de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos o partes de unión a antígeno que se unen al tercer bucle extracelular de CCR2.

[0052] Los genes de V_H , V_K y V_λ se clasifican en familias sobre la base de homología de secuencia. Dos genes de V_H , V_K o V_λ pertenecen a la misma familia si comparten la misma secuencia de nucleótidos en más del 80% de las posiciones. Un anticuerpo anti-CCR2 puede comprender una cadena ligera humana kappa (V_K) o una cadena ligera lambda humana (V_λ) o una secuencia de aminoácidos derivada de las mismas. En algunos casos que comprenden una cadena ligera lambda, el dominio variable de cadena ligera (V_L) utiliza un gen humano de la familia $V_{\lambda 1}$, $V_{\lambda 2}$, $V_{\lambda 3}$, $V_{\lambda 4}$, $V_{\lambda 5}$, $V_{\lambda 6}$, $V_{\lambda 7}$, $V_{\lambda 8}$, $V_{\lambda 9}$ o $V_{\lambda 10}$ (Williams SC et al *J. Mol Bio.* 264: 220-232 (1996)).

[0053] En algunos casos que comprende una cadena ligera kappa, el dominio variable de cadena ligera (V_L) utiliza un gen humano de la familia $V_{\kappa I}$, $V_{\kappa II}$, $V_{\kappa III}$, $V_{\kappa IV}$, $V_{\kappa V}$ o $V_{\kappa VI}$ (Cox JPL, et al., *Eur J. Immunol* 24: 827-836 (1994)), preferiblemente un $V_{\kappa I}$, $V_{\kappa II}$, $V_{\kappa IV}$ o $V_{\kappa VI}$, preferiblemente un gen de la familia $V_{\kappa I}$ o $V_{\kappa VI}$. En algunos casos, la secuencia de línea germinal de cadena ligera se selecciona a partir de secuencias V_κ humanas, incluyendo, pero no limitado a, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, 01, 011, 012, 014, 018, 02, 04, y 08. En ciertos casos, este gen de línea germinal humana de cadena ligera se selecciona de V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, y V5-6. En ciertos casos, la cadena ligera utiliza un gen de línea germinal humana $V_{\kappa I}$ 012, $V_{\kappa II}$ A1, $V_{\kappa IV}$ B3 o $V_{\kappa VI}$ A26.

[0054] Un anticuerpo anti-CCR2 puede comprender un dominio variable de cadena pesada (V_H) que utiliza un gen humano de la familia V_{H1} , V_{H2} , V_{H3} , V_{H4} , V_{H5} , V_{H6} o V_{H7} . En ejemplos particulares, este gen de línea germinal humana de cadena pesada se selecciona de VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2 -26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4 -28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1, y VH7-81. En ciertos casos, la cadena pesada utiliza un gen humano de V_{H1} 1-46 o V_{HIII} 3-30.

[0055] En casos particulares, la región variable de cadena ligera y/o la región variable de cadena pesada comprenden una región armazón o al menos una parte de una región armazón (por ejemplo, que contiene 2 ó 3 subregiones, tales como FR2 y FR3). En ciertos casos, al menos FRL1, FRL2, FRL3, o FRL4 es totalmente humano. En otros ejemplos, al menos FRH1, FRH2, FRH3, o FRH4 es totalmente humano. En algunos casos, al menos FRL1, FRL2, FRL3, o FRL4 es una secuencia de la línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana) o comprende secuencias de consenso humanas para el armazón en particular (fácilmente disponibles en las fuentes de secuencias de Ig humanas conocidas descritas en el presente documento). En otros ejemplos, al menos FRH1, FRH2, FRH3, o FRH4 es una secuencia de la línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana) o comprende secuencias de consenso humanas para el armazón particular.

[0056] En algunos casos, el V_L del anticuerpo CCR2 comprende una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos de la línea germinal del gen humano. En algunos casos, el V_L del anticuerpo anti-CCR2 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos, las sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos con relación a la línea germinal están en una o más de las mismas posiciones que la sustitución, deleción y/o inserción con relación a la línea germinal en una cualquiera o más de los V_L de los anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P. Por ejemplo, el V_L de un anticuerpo anti-CCR2 puede contener una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con la línea germinal encontrada en el V_L de anticuerpo 4.40. En algunos casos, los cambios de aminoácidos están en una o más de las mismas posiciones, pero implican una sustitución, deleción y/o inserción diferentes en comparación con la línea germinal. En algunos casos, la sustitución puede representar sustituciones de aminoácidos conservativas en dicha posición o posiciones en relación con el aminoácido en el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, si una posición particular en uno de estos anticuerpos está sustituida en comparación con la línea germinal y es glutamato, se puede sustituir el aspartato en esa posición. Del mismo modo, si una sustitución de aminoácidos en comparación con la línea germinal es serina, se puede sustituir de forma conservativa treonina por serina en esa posición.

[0057] En algunos casos, la cadena ligera del anticuerpo anti-CCR2 humano comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable (V_L) del anticuerpo 4.40 (SEQ ID NO: 101); 4.9 (SEQ ID NO: 29); 4.22 (SEQ ID NO: 65); 4.39 (SEQ ID NO: 194); o 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO: 113); o dicha secuencia de aminoácidos que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácidos no conservativas. En algunos casos, la cadena ligera puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 independientemente seleccionadas de la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera del anticuerpo 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P. En algunos casos, la cadena ligera del anticuerpo anti-CCR2 comprende una cadena ligera CDR1, CDR2, y CDR3, cada una de los cuales se selecciona independientemente de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 4.40 (SEQ ID NO: 100); 4.9 (SEQ ID NO: 28); 4.22 (SEQ ID NO: 64); 4.39 (SEQ ID NO: 193); o 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO: 112). En ciertos casos, la cadena ligera del anticuerpo anti-CCR2 comprende la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_L de un anticuerpo seleccionado de 4.40 (SEQ ID NO: 101); 4.9 (SEQ ID NO: 29); 4.22 (SEQ ID NO: 65); 4.39 (SEQ ID NO: 194); o 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO: 113). Los identificadores de secuencia se enumeran para las CDR de ciertos anticuerpos en la Tabla 8.

[0058] Con respecto a la cadena pesada, en algunos casos, el dominio variable (V_H) utiliza una secuencia del gen V_H 3-30 o V_H 1-46 humano. En algunos casos, la secuencia de V_H del anticuerpo anti-CCR2 contiene una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones (adiciones) de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos, el dominio variable de la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, ó 17 sustituciones, deleciones y/o inserciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos, la sustitución es una sustitución no conservativa en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos, la sustitución, deleción y/o inserción de aminoácidos se realizan en una o más de las mismas posiciones que las mutaciones de la línea germinal en uno cualquiera o más de los V_H de los anticuerpos 4.40, 4.22, 4.39 o 4.9. En otros casos, la sustitución, deleción y/o inserción de aminoácidos están en una o más de las mismas posiciones, pero implican una sustitución, deleción y/o inserción diferente que en el anticuerpo de referencia. En algunos casos, el anticuerpo comprende una cadena pesada CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o la SEQ ID NO: 203.

[0059] En algunos casos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de V_H del anticuerpo 4.40 (SEQ ID NO: 83); 4.22 (SEQ ID NO: 47); 4.9 (SEQ ID NO: 11); 4.39 (SEQ ID NO: 176); o dicha secuencia de aminoácidos V_H que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 6, 8, o 10 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácidos no conservativas. En algunos casos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos desde el comienzo de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos anteriores.

[0060] En algunos casos, la cadena pesada comprende la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 4.40, 4.22, 4.39 o 4.9.

[0061] En algunos casos, las CDR de cadena pesada se seleccionan independientemente de las CDR de los anticuerpos 4.40, 4.22, 4.39 o 4.9. En otro caso, la cadena pesada comprende CDR seleccionadas independientemente de dos o más regiones V_H seleccionadas de 4.40 (SEQ ID NO: 83); 4.22 (SEQ ID NO: 47); 4.39 (SEQ ID NO: 176) o 4.9 (SEQ ID NO: 11). En otro caso, el anticuerpo comprende una cadena ligera como se describe anteriormente y una cadena pesada como se describe anteriormente. En un caso adicional, las CDR de cadena ligera y las CDR de cadena pesada son del mismo anticuerpo.

[0062] Un tipo de sustitución de aminoácidos que se puede realizar es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que pueden ser químicamente reactivas, por otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. En un caso, hay una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución puede realizarse en una región armazón de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunos casos, la cisteína es canónica.

[0063] Otro tipo de sustitución de aminoácidos que se puede realizar es cambiar cualquier sitio proteolítico potenciales en el anticuerpo. Tales sitios pueden aparecer en la región armazón de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de residuos de cisteína y la eliminación de los sitios proteolíticos pueden disminuir el riesgo de cualquier heterogeneidad en el producto de anticuerpo y por lo tanto aumentar su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácidos es eliminar los pares de asparagina-glicina, que forman sitios potenciales de desamidación, mediante la alteración de uno o ambos residuos. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos se utiliza para insertar o eliminar un sitio de glicosilación. En algunos casos, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-CCR2 puede ser eliminado proteolíticamente o genéticamente. En varios casos, las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos anti-CCR2 pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

[0064] En un aspecto, los anticuerpos se producen mediante un hibridoma.

[0065] La Tabla 1 enumera los identificadores de secuencia (SEQ ID NO) de los ácidos nucleicos que codifican la longitud completa, y las partes que comprenden dominios variables, de las cadenas pesadas y ligeras, y las correspondientes secuencias de aminoácidos deducidas de los anticuerpos de ejemplo.

TABLA 1

ANTICUERPOS ANTI-CCR2 HUMANOS								
IDENTIFICADOR DE SECUENCIA (SEQ ID NO:)								
	Parte que comprende dominio variable				Longitud completa			
	Pesada (V _H)		Ligera (V _L)		Pesada		Ligera	
	Proteína	ADN	Proteína	ADN	Proteína	ADN	Proteína	ADN
4.40.2	83	74	101	92	82	73	100	91
4.40.2 A68G S230P	83	74	113	110	116	115	112	109
4.9.2	11	2	29	20	19	1	28	19
4.22.3	47	38	65	56	46	37	64	55
4.39.3	176	167	194	185	175	166	193	184

[0066] También se proporcionan variantes de cadena pesada y/o cadena ligera de algunos de los anticuerpos anti-CCR2 humano indicados anteriormente, que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos. Para designar las variantes, la primera letra es el símbolo de una letra para el aminoácido de la cadena de anticuerpo de origen natural, el número se refiere a la posición del aminoácido (en la que la posición uno es el aminoácido N-terminal), y la segunda letra es el símbolo de una letra para el aminoácido variante. En algunos casos, se proporcionan variantes de cadena pesada. Una de dichas variantes de la cadena pesada es una mutación que estabiliza la región bisagra para reducir la formación de un medio-monómero (Angal, S. et al Molecular Immunology. 30: 105-108 (1993)). Una de dichas mutaciones que estabiliza la región bisagra de la variante de la cadena pesada de anticuerpo 4.40 tiene una sustitución de prolina por serina en la posición 230 de la SEQ ID NO: 82. La secuencia de ADN que codifica la variante S230P tiene un codón CCA que comienza en la posición 688 de la SEQ ID NO: 115.

[0067] También se proporcionan cadenas ligeras variantes de anticuerpo monoclonal 4.40. A68G que es una variante de cadena ligera 4.40, representada por la SEQ ID NO: 113, en la que el resto 68 es un residuo de glicina. En la secuencia

de ADN, la variante A68G 4.40 está codificada por SEQ ID NO: 109, en la que el codón que comienza en la posición 252 es GGG.

5 **[0068]** En otros casos, se pueden producir anticuerpos que contienen combinaciones de variantes de aminoácidos. Un ejemplo de una combinación de variantes es el anti-CCR2 anticuerpo 4.40 A68G S230P, que comprende la sustitución en la cadena ligera A68G y la sustitución en la cadena pesada S230P en el contexto del anticuerpo 4.40. Se incluyen más combinaciones de una variante de cadena pesada y una variante de cadena ligera 4.40.

10 **[0069]** En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 es A68G S230P 4.40, 4.22, 4.39, 4.40 o 4.9. En aún otros casos, se incluyen anticuerpos que comprenden secuencias de aminoácidos del dominio variables con más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98% o más de 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los anticuerpos anti-CCR2 humanos enumerados anteriormente.

15 Clase y subclase de anticuerpos anti-CCR2

[0070] La clase y subclase de anticuerpos anti-CCR2 se pueden determinar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo se pueden determinar usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particulares de anticuerpo. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y subclase se pueden determinar mediante ELISA, o transferencia Western, así como otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase se pueden determinar mediante secuenciación de todo o una parte de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y la determinación de la clase y subclase de los anticuerpos.

25 **[0071]** En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-CCR2 puede ser una molécula IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 es una IgG, que pertenece a, por ejemplo, una subclase IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 es una IgG4. En otro caso, el anticuerpo es un isoalotipo IgG4 (Ellison J. y Hood L., PNAS 79: 1984-1988 (1982); y Brusco A. et al, Eur J. Immunogeneticsl. 25: 349-355 (1998)).

30 Afinidad de unión de los anticuerpos anti-CCR2 a CCR2

[0072] En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 se unen a CCR2 con una afinidad elevada.

35 **[0073]** En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 se unen con alta afinidad al primer bucle extracelular de CCR2, al segundo bucle extracelular de CCR2, o a un epítipo formado por el 1er y 2º bucles extracelulares.

[0074] En un caso relacionado, los anticuerpos anti-CCR2 se unen a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 128 o en la SEQ ID NO: 129.

40 **[0075]** En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 no se unen al tercer bucle extracelular de CCR2 o al dominio N-terminal de CCR2.

45 **[0076]** En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 no se unen a un péptido que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 127 o en la SEQ ID NO: 130. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 se une al primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2, con una K_D de aproximadamente 2×10^{-7} M o menos, con una K_D de aproximadamente 2×10^{-8} M o menos, con una K_D de aproximadamente 2×10^{-9} M o menos, con una K_D de aproximadamente 1×10^{-9} M o menos, con una K_D de aproximadamente 9×10^{-10} M o menos, con una K_D de aproximadamente 8×10^{-10} M o menos, con una K_D de aproximadamente 7×10^{-10} M o menos, con una K_D de aproximadamente 6×10^{-10} M o menos, con una K_D de aproximadamente 5×10^{-10} M o menos, con una K_D de aproximadamente 4×10^{-10} M o menos, con una K_D de aproximadamente 3×10^{-10} M o menos, o con una K_D de aproximadamente 2×10^{-10} M o menos. En ciertos casos, el anticuerpo se une a CCR2, o al primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2, con sustancialmente la misma K_D que un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4,40 A68G S230P. Todavía en otro caso, el anticuerpo se une a CCR2, o al primero y/o segundo bucles extracelulares de CCR2, con sustancialmente la misma K_D que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_H que se encuentra en las SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 176 o la SEQ ID NO: 47. Todavía en otro caso, el anticuerpo se une a CCR2 con sustancialmente la misma K_D que un anticuerpo que comprende las CDR de un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_L que se encuentra en las SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 194 o la SEQ ID NO: 65, o que comprende las CDR de un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_H que se encuentra en las SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 176 o la SEQ ID NO: 47.

[0077] En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 puede tener una constante de velocidad de disociación (k_{off}) baja. En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 puede unirse a CCR2, o más preferiblemente al primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2, con una k_{off} de $1,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menor, una k_{off} de $5,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menor o una k_{off} de $2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menor. En algunos casos, la k_{off} puede ser sustancialmente la misma que un anticuerpo descrito en el presente documento, incluyendo un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 y 4.40 A68G S230P. En algunos casos, el anticuerpo puede unirse a CCR2, o al primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2, con sustancialmente la misma k_{off} que un anticuerpo que comprende las CDR de una cadena pesada, o las CDR de una cadena ligera, de un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9 y 4.40 A68G S230P. En algunos casos, el anticuerpo puede unirse a CCR2, o al primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2, con sustancialmente la misma k_{off} que un anticuerpo que comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_H que se encuentra en las SEQ ID NO: 83, o SEQ ID NO: 11, (ii) un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_L que se encuentra en las SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 29, o (iii) ambos (i) y (ii). En otro caso, el anticuerpo puede unirse a CCR2, o al primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2, con sustancialmente la misma k_{off} que un anticuerpo que comprende las CDR de un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_L que se encuentra en las SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 113, o SEQ ID NO: 29; y las CDR de un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_H que se encuentra en las SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 11.

[0078] La tasa de afinidad de unión y la velocidad de disociación de un anticuerpo anti-CCR2 a CCR2 pueden ser determinadas mediante procedimientos conocidos en la técnica. La afinidad de unión se puede medir mediante ELISA, RIA, citometría de flujo, resonancia de plasmón de superficie, tal como BIACORE®. La velocidad de disociación se puede medir mediante resonancia de plasmón de superficie. Se puede determinar si un anticuerpo tiene sustancialmente la misma K_D que un anti anticuerpo anti-CCR2 mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica. El ejemplo 5 ejemplifica un procedimiento para determinar constantes de afinidad de anticuerpos monoclonales anti-CCR2.

Identificación de epítomos de CCR2 reconocidos por anticuerpos anti-CCR2

[0079] Se proporcionan anticuerpos monoclonales anti-CCR2 humanos que se unen a CCR2 y pueden competir o competir de forma cruzada con y/o se unen al mismo epítipo que: (a) un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 y 4.40 A68G S230P; (B) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos del dominio variable que se encuentra en las SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 176 o la SEQ ID NO: 47, (c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos del dominio variable que se encuentra en las SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 194, o SEQ ID NO: 65 o (d) un anticuerpo que comprende tanto una cadena pesada del dominio variable como se define en (b) como una cadena ligera del dominio variable como se define en (c). Si dos anticuerpos recíprocamente compiten entre sí por la unión a CCR2, se dice que compiten de forma cruzada.

[0080] Se puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítipo, compite o compite de forma cruzada por la unión con un anticuerpo anti-CCR2 proporcionado en el presente documento mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica. En un caso, se permite que el anticuerpo anti-CCR2 proporcionada en el presente documento se una a CCR2 en condiciones de saturación y a continuación se mide la capacidad del anticuerpo de ensayo para unirse a CCR2. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de unirse a CCR2, al mismo tiempo que el anticuerpo anti-CCR2 proporcionado, entonces el anticuerpo de ensayo se une a un epítipo diferente que el anticuerpo anti-CCR2. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de unirse a CCR2 al mismo tiempo, entonces el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo, un epítipo de solapamiento, o un epítipo que está en estrecha proximidad con el epítipo unido por el anticuerpo anti-CCR2 humano proporcionado en el presente documento. Para determinar si un anticuerpo de ensayo compite de forma cruzada con un anticuerpo de referencia, el experimento se lleva a cabo invirtiendo los anticuerpos, es decir, se permite que el anticuerpo de ensayo se una a CCR2 y a continuación se mide la capacidad del anticuerpo anti-CCR2 proporcionado en el presente documento de unirse a CCR2. Estos experimentos se pueden realizar utilizando ELISA, RIA, BIACORE® o citometría de flujo (FACS).

Inhibición de la actividad de CCR2 por anticuerpo anti-CCR2

[0081] En algunos casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhiben la señalización mediada por CCR2. En otros casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhiben la señalización mediada por MCP-1, MCP-2, MCP-3, y/o MCP-4 a través de CCR2. En otros casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhiben la unión de MCP-1 MCP-2, MCP-3 y/o MCP-4 a CCR2. En un caso, el CCR2 es CCR2 humano. En algunos casos, el CCR2 es CCR2A humano, CCR2B o ambos. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 es un anticuerpo humano.

60

[0082] El IC₅₀ de un anticuerpo anti-CCR2 se puede medir en ensayos de unión de ligandos, tales como ELISA, RIA, o ensayos relacionados y ensayos basados en células, tales como ensayos de quimiotaxis de células que expresan CCR2. En varios casos, el anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo inhibe la unión a ligando entre MCP-1 y CCR2 con una IC₅₀ de no más de 5 µg/ml, no más de 1 µg/ml, no más de 0,5 µg/ml, o no más de 0,20 µg/ml tal como se mide mediante un ensayo ELISA.

[0083] En otro caso, se proporciona un anticuerpo anti-CCR2 que reduce la activación de CCR2 en presencia de ligandos de CCR2, tales como MCP-1 (CCL2), MCP-2, MCP-3, y/o MCP-4. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 puede inhibir el ligando de CCR2 inducido por (i) la activación de la proteína G, (ii) la activación de la adenilato ciclasa, (iii) la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), (iv) la movilización de calcio citosólico, (v) la fosforilación de ERK, (vi) la quimiotaxis, o (vii) la polimerización de actina. Se puede determinar si un anticuerpo anti-CCR2 puede prevenir, inhibir o reducir la activación de CCR2 en presencia de MCP-1 mediante la determinación de la relación GTP/GDP de las proteínas G en células marcadas con GTP radiomarcado, mediante la medición de la incorporación de GTPγS incorporación, mediante la medición del flujo de calcio citosólico utilizando cromóforos de calcio, o midiendo el estado de fosforilación de MAPK en una célula. Los ensayos para detectar la activación de CCR2 y/o la unión de MCP-1 a CCR2 se describen, por ejemplo, en Gabrilin et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 327 (2): 533-40 (2005), y Jimenez-Sainz et al, *Mol Pharmacol.* 64 (3): 773-82 (2003).

[0084] En un caso, se podrían determinar los niveles de activación de CCR2 usando un ensayo de quimiotaxis. En algunos casos, la IC₅₀, medida usando un ensayo de quimiotaxis, no es superior a 5 µg/ml, no es superior a 1 µg/ml, no es superior a 0,5 µg/ml, o no es superior a 0,20 µg/ml. El ejemplo 10 es un ejemplo de un tipo de ensayo que mide la inhibición de CCR2 por un anticuerpo anti-CCR2 mediante el control de la movilización de calcio.

[0085] En otro aspecto, el contacto de una célula con el anticuerpo puede dar lugar a una regulación por disminución de la expresión de CCR2 en la superficie celular después de la incubación con el anticuerpo. En algunos casos, la incubación puede ser un período de tiempo corto (por ejemplo, 4 horas) o un período de tiempo más largo (por ejemplo, 24 horas). Una regulación por disminución de la expresión de CCR2 en la superficie celular se puede medir usando transferencia Western, ELISA, o análisis FACS. En casos particulares, el contacto de una célula con el anticuerpo puede dar como resultado al menos una disminución del 6%, al menos una disminución del 10%, al menos una disminución del 20%, al menos una disminución del 30%, o al menos una disminución del 50% de la expresión de CCR2 en la superficie celular medida por transferencia Western o ELISA.

[0086] En otro aspecto, el anticuerpo reduce la fosforilación de pERK inducida MCP-1. Una regulación a la baja de la fosforilación de pERK inducida MCP-1 se puede medir usando transferencia Western, ELISA, o análisis FACS. En casos particulares, el anticuerpo produce al menos una disminución del 6%, al menos una disminución del 10%, al menos una disminución del 20%, al menos una disminución del 30%, o al menos una disminución del 50% de la fosforilación de pERK inducida por MCP-1 medida mediante análisis FACS.

Inhibición de la quimiotaxis in vivo con anticuerpos anti-CCR2

[0087] Según algunos casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhiben la quimiotaxis de células inmunitarias in vivo. Las células inmunitarias cuya quimiotaxis es inhibida incluyen células mononucleares de sangre periférica, células THP, monocitos, linfocitos T de memoria, células dendríticas, basófilos, células asesinas naturales y células CCR2+ adoptivamente transferidas. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 inhibe la quimiotaxis de células inmunitarias en respuesta a una o más de MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4. En un caso, la quimioquina es MCP-1. Todavía en otro caso, la quimioquina es MCP-3. El anticuerpo anti-CCR2 puede inhibir la quimiotaxis en sitios de inflamación o lesión.

[0088] Según algunos casos, también se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhiben la quimiotaxis de las células no inmunitarias, incluyendo, pero no limitadas a, sinoviocitos de tipo fibroblastos (FLS) (ver García-Vicuna et al., *Arthritis Rheum.* 50 (12): 3866-77 (2004)), células madre neurales adultas (ver Widera et al, *Eur J Cell Biol* 83 (8): 381-7 (2004)) y astrocitos fetales humanos (véase Andjelkovic et al., *J Neurosci Res* 70 (2): 219-31 (2002)).

[0089] En un caso, el anticuerpo inhibe la quimiotaxis celular en comparación con la quimiotaxis de células en un animal no tratado. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 reduce la quimiotaxis en al menos el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. En un caso, la inhibición de la quimiotaxis se mide por lo menos 1 hora después de que los animales hayan iniciado el tratamiento con el anticuerpo. En otro caso, la inhibición de la quimiotaxis se mide al menos 7 días después de que los animales hayan iniciado el tratamiento con el anticuerpo. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 da lugar a la inhibición de la quimiotaxis de al menos del 10% al 100%.

Especies y selectividad molecular

[0090] En otro aspecto, los anticuerpos anti-CCR2 demuestran selectividad de especie y molecular. En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 se une a CCR2 humano y de cynomolgus. El anticuerpo anti-CCR2 puede unirse a CCR2 adicional de especies de primates no humanos. En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 no se une a CCR2 de ratón o rata. Siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva, se puede determinar la selectividad de especies para el anticuerpo anti-CCR2 usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar la selectividad de especies usando transferencia Western, citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación o RIA. En un caso, se puede determinar la selectividad de especies usando citometría de flujo. En otro caso, se puede determinar la especificidad de especie mediante la evaluación de la capacidad del anticuerpo para inhibir las respuestas funcionales de MCP-1 utilizando células de esa especie. Esto puede incluir la quimiotaxis, la polimerización de actina, la movilización de calcio, etc.

[0091] En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 tiene una selectividad para el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 126 (CCR2B humano) sobre el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID No: 131 (CCR5 humano). En otro caso, el anti-CCR2 anticuerpo tiene selectividad para CCR2 sobre CCR5 de al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 humanos se unen a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO: 126.

[0092] En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 puede tener una selectividad para el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 125 (CCR2A humano) sobre el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 131 (CCR5 humano) de al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 humanos se unen a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO: 125.

[0093] Se puede determinar la selectividad del anticuerpo anti-CCR2 para CCR2 usando procedimientos bien conocidos en la técnica siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Por ejemplo, se puede determinar la selectividad usando transferencia Western, citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación o RIA, y/o ensayos funcionales, tales como la quimiotaxis, la movilización de calcio, o la polimerización de actina.

Procedimientos de producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos*Inmunización*

[0094] En algunos casos, los anticuerpos humanos se producen mediante inmunización de un animal transgénico no humano que comprende dentro de su genoma alguno o todos los locus de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina humana con un antígeno de CCR2. En un caso, el animal no humano es un animal XENOMOUSE® (Amgen Fremont, Inc. (anteriormente Abgenix, Inc.), Fremont, CA).

[0095] Los ratones XENOMOUSE® son cepas de ratón modificadas que comprenden grandes fragmentos de locus de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina humana y son deficientes en la producción de anticuerpos de ratón Véase, por ejemplo, Green et al, Nature Genetics 7: 13-21 (1994) y Patentes de Estados Unidos 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 6.162.963 y 6.150.584. Ver también WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560, y WO 00/037504.

[0096] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar anticuerpos anti-CCR2 de animales no humanos, no ratones mediante la inmunización de animales transgénicos no humanos que comprenden locus de inmunoglobulina humana con un antígeno de CCR2. Pueden producirse tales animales usando los procedimientos descritos en los documentos citados anteriormente. Los procedimientos descritos en estos documentos pueden modificarse como se describe en la patente US 5.994.619. La patente de Estados Unidos 5.994.619 describe procedimientos para la producción de nuevas células y líneas celulares de masa celular interna cultivada (CICM), derivadas de cerdos y vacas, y células de CICM transgénicas en las que se ha insertado ADN heterólogo. Las células transgénicas de CICM pueden usarse para producir embriones transgénicos clonados, fetos y descendencia. La patente '619 también describe procedimientos de producción de animales transgénicos que son capaces de transmitir el ADN heterólogo a su progenie. En casos preferidos los animales no humanos son mamíferos, particularmente ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos.

[0097] Los ratones XENOMOUSE® producen un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos y generan anticuerpos humanos específicos de antígeno. En algunos casos, los ratones XENOMOUSE® contienen aproximadamente 80% del repertorio de genes V de anticuerpo humano a través de la introducción de fragmentos de configuración de línea germinal de los locus de cadena pesada humana y locus de cadena ligera kappa humana. En otros

casos, los ratones XENOMOUSE® contienen además aproximadamente todo el locus de cadena ligera lambda humana Véase Mendez et al, Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits, J. Exp Med 188: 483-495 (1998), y WO 98/24893.

5 **[0098]** En otro caso, los anticuerpos se generan utilizando la tecnología VELOCIMOUSE® (Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY.) para la generación inmediata de ratones genéticamente alterados directamente a partir de células madre embrionarias modificadas (ES) (Poueymirou WT, et al., Nature Biotechnology 25: 91-99 (2007)).

10 **[0099]** En algunos casos, el animal no humano que comprende genes de inmunoglobulina humana son animales que tienen un "minilocus" de inmunoglobulina humana. En el enfoque de minilocus, un locus de Ig exógeno es mimetizado por medio de la inclusión de genes individuales del locus de Ig. Por lo tanto, uno o más genes de V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, un dominio constante mu, y un segundo dominio constante (preferiblemente un dominio constante gamma) se forman en un constructo para la inserción en un animal. Este enfoque se describe, entre otros, en la patente de los Estados Unidos Nos. 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 15 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, y 5.643.763.

[0100] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar anticuerpos anti-CCR2 humanizados. En algunos casos, los animales no humanos se inmunizan con un antígeno de CCR2 tal como se describe en el presente documento en condiciones que permiten la producción de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos se aíslan de los 20 animales, y se aíslan los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo anti-CCR2 de interés. Estos ácidos nucleicos se modifican posteriormente usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica y tal como se describe más adelante para reducir la cantidad de secuencia no humana, es decir, para humanizar el anticuerpo para reducir la respuesta inmune en los seres humanos

25 **[0101]** En algunos casos, el antígeno de CCR2 es CCR2 aislado y/o purificado. En un caso, el antígeno de CCR2 es CCR2 humano. En algunos casos, el antígeno de CCR2 es un fragmento de CCR2. En algunos casos, el fragmento de CCR2 es un bucle extracelular, el dominio N-terminal o el extremo C-terminal de CCR2. En ciertos casos, el fragmento de CCR2 comprende el primer o segundo bucle extracelular de CCR2. En otros casos, el fragmento de CCR2 comprende la 30 secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 128 o la SEQ ID NO: 129.

[0102] En otros casos, el fragmento de CCR2 no comprende el tercer bucle extracelular o el dominio N-terminal de CCR2.

35 **[0103]** En otros casos, el fragmento de CCR2 no comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 127 o la SEQ ID NO: 130. En algunos casos, el fragmento de CCR2 comprende al menos un epítipo de CCR2. En otros casos, el antígeno de CCR2 es una célula que expresa o sobreexpresa CCR2 o un fragmento inmunogénico de la misma en su superficie. En algunos casos, el antígeno de CCR2 es una proteína de fusión de CCR2. En algunos casos, el CCR2 es un inmunógeno de péptido sintético.

40 **[0104]** La inmunización de animales puede ser mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los procedimientos para la inmunización de animales no humanos, tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado y caballos, son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, supra, y la patente de Estados Unidos 5.994.619. En un caso, el antígeno de CCR2 se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Los 45 adyuvantes de ejemplo incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Dichos adyuvantes pueden proteger al polipéptido de la dispersión rápida mediante el secuestro en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan el huésped para secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Si se está administrando un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, extendido a lo largo de varias semanas. El ejemplo 1 ejemplifica un procedimiento para producir anticuerpos monoclonales anti-CCR2 en ratones XENOMOUSE®.

50 *Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos*

55 **[0105]** Después de la inmunización de un animal con un antígeno de CCR2, los anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos se pueden obtener a partir del animal. En algunos casos, el suero que contiene anticuerpos anti-CCR2 se obtiene del animal por sangrado o sacrificio del animal. El suero puede usarse como se obtiene del animal, una fracción de inmunoglobulina se puede obtener a partir del suero, o los anticuerpos anti-CCR2 pueden purificarse a partir del suero.

60 **[0106]** En algunos casos, las líneas celulares inmortalizadas productoras de anticuerpos se preparan a partir de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, se sacrifica el animal y la sangre periférica, ganglio linfático y/o células B esplénicas se inmortalizan por cualquier medio conocido en la técnica. Los procedimientos de inmortalización de células incluyen, pero no se limitan a, su transfección con oncogenes, su infección con un virus oncogénico y su cultivo

en condiciones que seleccionan células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinógenos o mutantes, fusionarlas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivar un gen supresor de tumor. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, supra. Si se usa la fusión con células de mieloma, las células de mieloma preferentemente no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Las células inmortalizadas son seleccionadas utilizando CCR2, una parte del mismo, o una célula que expresa CCR2. En un caso, la parte de CCR2 (i) comprende el primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2; (ii) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 128 y/o SEQ ID NO: 129; (iii) no comprende el tercer bucle extracelular y/o el dominio N-terminal de CCR2; (iv) no comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 127 y/o SEQ ID NO: 130; o (v) combinaciones de los mismos. En un caso, la selección inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo. Un ejemplo de detección ELISA se proporciona en el documento WO 00/37504.

[0107] Las células productoras de anticuerpos anti-CCR2, por ejemplo, los hibridomas, se seleccionan, se clonan y, se criban adicionalmente para características deseables, incluyendo el crecimiento robusto, alta producción de anticuerpos y características de anticuerpos deseables, tal como se discute más adelante. Los hibridomas se puede expandir in vivo en animales singeneicos, en animales que carecen de un sistema inmunológico, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivo celular in vitro. Los procedimientos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos para los expertos en la técnica.

[0108] En un aspecto, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa genes de inmunoglobulina humanos y las células B esplénicas se fusionan a una línea celular de mieloma de la misma especie que el animal no humano. En un caso de ejemplo, el animal inmunizado es un ratón XENOMOUSE® y la línea celular de mieloma es un mieloma no secretor de ratón. En un caso, la línea celular de mieloma es P3-X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection). Véase, por ejemplo, el ejemplo 1.

[0109] El cribado de las células productoras de anticuerpos inmortalizados para identificar un anticuerpo dirigido al primer y/o segundo bucle extracelular de CCR2 puede conseguirse mediante pruebas si los anticuerpos producidos por la célula se unen a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del primer o segundo bucle extracelular de CCR2. Alternativamente o en combinación, los anticuerpos producidos por la célula se pueden ensayar para la unión a receptores de quimioquinas quiméricos que tienen principalmente la secuencia de otro receptor de quimioquina, pero las secuencias del primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2. Véase el Ejemplo 8, que ejemplifica el uso de quimeras para mapear el epítipo de anticuerpos anti-CCR2. En un caso complementario, los anticuerpos producidos por la célula que se sabe que se unen a CCR2 pueden ser ensayados para la unión a receptores de quimioquinas quiméricos que tienen principalmente la secuencia de CCR2, pero que carecen del primer y/o segundo bucles extracelulares de tipo natural de CCR2, por ejemplo, tienen el primero y/o segundo bucles extracelulares de otro receptor de citoquina o contienen mutaciones en uno o ambos de estos bucles extracelulares.

[0110] En otro aspecto, se proporcionan células y líneas celulares (incluyendo hibridomas) que producen un anticuerpo anti-CCR2 humano. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 humano producido por la célula, la línea celular o hibridoma o es un antagonista de CCR2. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 humano (i) se une al primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2; (ii) se une a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 128 y/o SEQ ID NO: 129; (iii) no se une al tercer bucle extracelular y/o el dominio N-terminal de CCR2; (iv) no se une a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 127 y/o SEQ ID NO: 130; o (v) combinaciones de los mismos. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 humano producido por la célula, línea celular o hibridoma no se une al tercer bucle extracelular con alta afinidad, no se une al dominio N-terminal de CCR2 con alta afinidad, o no se une a ninguno con alta afinidad.

[0111] En otro aspecto más, un animal transgénico se inmuniza con CCR2, se aíslan células primarias, por ejemplo, células de bazo o células de sangre periférica de un animal transgénico inmunizado y se identifican células individuales productoras de anticuerpos específicos para el antígeno deseado. Por ejemplo, el ARNm poliadenilado de cada célula individual se aísla y se realiza una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) usando cebadores de sentido que hibridan con secuencias de región variable, por ejemplo, cebadores degenerados que reconozcan la mayor parte o todas las regiones FR1 de genes de la región variable de cadena pesada y ligera humana y cebadores anti-sentido que hibridan con secuencias de la región constante o de unión (J). Los ADNc de los dominios variables de cadena pesada y ligera se clonan a continuación y se expresan en cualquier célula huésped adecuada, por ejemplo, una célula de mieloma, como anticuerpos quiméricos con regiones constantes de inmunoglobulina respectivas, tales como la cadena pesada y los dominios constantes κ o λ . Ver Babcook, JS et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 7843-48 (1996). Los anticuerpos anti-CCR2 pueden ser identificados y aislados tal como se describe en el presente documento a continuación.

[0112] En otro aspecto, se pueden utilizar técnicas de expresión en fagos para proporcionar bibliotecas que contengan un repertorio de anticuerpos con diferentes afinidades para CCR2. Se pueden utilizar células B primarias directamente como una fuente de ADN. La mezcla de los ADNc obtenidos a partir de células B, por ejemplo, derivadas de bazos, se utiliza

para preparar una biblioteca de expresión, por ejemplo, una biblioteca de expresión en fago transfectada en *E. coli*. Las células resultantes se ensayan para determinar la inmunorreactividad a CCR2. Las técnicas para la identificación de anticuerpos humanos de alta afinidad de tales bibliotecas son descritas por Griffiths et al, EMBO J. 13: 3245-3260 (1994); Nissim et al, *ibid*, pp 692-698 y por Griffiths et al, *ibid.*, 12: 725-734. En última instancia, los clones de la biblioteca se identifican que producen afinidades de unión de una magnitud deseada para el antígeno y el ADN que codifica el producto responsable de tal unión es recuperado y manipulado para la expresión recombinante estándar. Las bibliotecas de expresión en fagos también pueden construirse usando secuencias de nucleótidos previamente manipuladas y pueden cribarse de una manera similar. En general, los ADNc que codifican cadenas pesadas y ligeras son suministrados de forma independiente o unidos para formar análogos de Fv para la producción en la biblioteca de fagos.

[0113] La biblioteca de fagos se criba a continuación para los anticuerpos con las más altas afinidades para CCR2 y el material genético se recupera a partir del clon apropiado. Más rondas de cribado pueden aumentar la afinidad del anticuerpo original aislado.

Ácidos nucleicos, vectores, células huésped, y procedimientos recombinantes de preparación de anticuerpos

Ácidos nucleicos

[0114] También se incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-CCR2 o partes de unión a antígeno de los mismos. En algunos casos, diferentes moléculas de ácido nucleico codifican la cadena pesada y la cadena ligera de una inmunoglobulina anti-CCR2. En otros casos, la misma molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina anti-CCR2. En un caso, el ácido nucleico codifica un anticuerpo de CCR2, o parte de unión a antígeno del mismo.

[0115] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera (V_L) comprende un segmento de la familia de genes humanos V_κ1, V_κ2, V_κ3, V_κ4, V_κ5 o V_κ6, y un segmento de gen J_κ1, J_κ2, J_κ4, o J_κ5 con o sin mutaciones de la línea germinal.

[0116] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera, codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 sustituciones de la secuencia o secuencias de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de V_L que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o 1, 2 o 3 sustituciones no conservativas en comparación con las secuencias de V_L y J_κ de la línea germinal. Las sustituciones pueden estar en las regiones armazón, o en el dominio constante.

[0117] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de V_L que comprende una o más variantes en comparación con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a las variaciones halladas en la V_L de uno de los anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P. En algunos casos, el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de V_L que comprende una mutación en una o más de las mismas posiciones que las mutaciones de línea germinal en un anticuerpo de CCR2 proporcionado en el presente documento, pero que comprende una sustitución diferente, en algunos casos, una sustitución conservativa, en comparación con la sustitución en el anticuerpo proporcionado.

[0118] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica al menos tres sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal que se encuentra en la V_L de uno de los anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P.

[0119] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo monoclonal 4.40 (SEQ ID NO: 101), 4.9 (SEQ ID NO: 29), 4.22 (SEQ ID NO: 65), 4.39 (SEQ ID NO: 194) o 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO: 113), o una variante o parte de la misma. En algunos casos, el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende las CDR de cadena ligera de uno de dichos anticuerpos indicados anteriormente. En algunos casos, dicha parte es una parte contigua que comprende CDR1-CDR3.

[0120] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de V_L que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos de V_L de una cualquiera de una región V_L de los anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P, o una secuencia de aminoácidos de una región V_L de una cualquiera de SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 194 o SEQ ID NO: 65. Las moléculas de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos que codifican la región V_L que se encuentra en la SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 65.

[0121] En otro caso, el ácido nucleico codifica una cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P, o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 193 o la SEQ ID NO: 28, o comprendiendo dicha secuencia de cadena ligera una mutación, tal como una descrita en el presente documento.

[0122] Todavía en otro caso, la molécula de ácido nucleico codifica el dominio variable de la cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de gen V_H 3-30 o 1-46 humano o una secuencia derivada de la misma. En varios casos, la molécula de ácido nucleico utiliza una secuencia de gen V_H humano 3-30, una secuencia de gen D1-7 humano y una secuencia de gen J_H3B humano; una secuencia de gen V_H 1-46 humano, una secuencia de gen D1-7 humano y una secuencia de gen J_H3B humano; o secuencia derivada de los genes humanos.

[0123] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal de los genes V, D o J humanos. En algunos casos, dichas mutaciones se encuentran en la región V_H .

[0124] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a las mutaciones de aminoácidos que se encuentran en la V_H del anticuerpo monoclonal 4.40, 4.22, 4.39 o 4.9. En algunos casos, el ácido nucleico codifica al menos tres mutaciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de línea germinal que son idénticas a al menos tres mutaciones de aminoácidos que se encuentran en uno de los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente.

[0125] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de V_H de un anticuerpo monoclonal seleccionado de 4.40 (SEQ ID NO: 83), 4.22 (SEQ ID NO: 47), 4.39 (SEQ ID No: 176) o 4.9 (SEQ ID No: 11), una variante de la misma, o dicha secuencia que tiene mutaciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas. En varios casos, la secuencia codifica una o más CDR, una región CDR3, las tres CDR, una parte contigua que incluye CDR1-CDR3, o toda la región V_H , con o sin una secuencia señal.

[0126] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 175 o SEQ ID NO: 116, o dicha secuencia que tiene una secuencia señal. En algunos casos preferidos, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una parte de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 73 o SEQ ID NO: 115, o dicha secuencia que tiene una secuencia de señal. En algunos casos, dicha parte codifica la región V_H (con o sin una secuencia señal), una región CDR3, las tres CDR o una región contigua que incluye CDR1-CDR3.

[0127] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de V_H que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencias de aminoácidos de V_H de uno cualquiera de la región de V_H de los anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P, o una secuencia de aminoácidos de una región V_H de una cualquiera de SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 176 o SEQ ID NO: 11. También se incluyen ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos de 4.40 (SEQ ID NO: 83), 4.22 (SEQ ID NO: 47), 4.39 (SEQ ID NO: 176) o 4.9 (SEQ ID NO: 11), o a una región V_H de la misma, o que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 2 o que codifican una región V_H de las mismas.

[0128] En otro caso, el ácido nucleico codifica una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.22, 4.9, 4.39, o 4.40 A68G S230P, o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 175 o la SEQ ID NO: 116, con o sin una secuencia señal, o una cadena pesada que comprende una mutación, tal como una de las variantes descritas en el presente documento. Además, el ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 166 o la SEQ ID NO: 115, o una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende una mutación, tal como una de las variantes descritas en el presente documento.

[0129] Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CCR2 o partes de la misma se puede aislar de cualquier fuente que produce tal anticuerpo. En varios casos, las moléculas de ácido nucleico se aíslan a partir de una célula B aislada de un animal inmunizado con CCR2 o de una célula inmortalizada derivada de dicha célula B que expresa un anticuerpo anti-CCR2. Los procedimientos de aislamiento del ARNm que codifica un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. El ARNm se puede utilizar para producir ADNc para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o clonación de ADNc de genes de anticuerpos. En un caso, la molécula de ácido nucleico se aísla de un hibridoma que tiene como uno de sus compañeros de fusión una célula productora de inmunoglobulina humana de un animal transgénico no humano. En otros casos, la célula productora de inmunoglobulina humana se aísla de un animal XENOMOUSE®. En otro caso, la célula productora de inmunoglobulina

humana es de un animal transgénico no humano, no ratón, tal como se describe en el presente documento. En otro caso, el ácido nucleico se aísla de un animal no transgénico no humano. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de un animal no transgénico no humano, se pueden usar, por ejemplo, para anticuerpos humanizados.

5 **[0130]** En algunos casos, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CCR2 comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_H unido en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. Del mismo modo, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CCR2 puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_L unido en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena ligera de cualquier fuente.

10 **[0131]** En un aspecto adicional, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesada (V_H) y/o ligera (V_L) se "convierten" en genes de anticuerpos de longitud completa. En un caso, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H o V_L se convierten en genes de anticuerpos de longitud completa mediante la inserción en un vector de expresión que ya codifica los dominios constante de cadena pesada (C_H) o dominios constante de cadena ligera (C_L), respectivamente, de manera que el segmento V_H se une operativamente al segmento o segmentos de C_H dentro del vector, y/o el segmento V_L se une operativamente al segmento C_L dentro del vector. En otro caso, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H y/o V_L se convierten en genes de anticuerpos de longitud completa uniendo, por ejemplo, ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica un dominios V_H y/o V_L a una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio C_H y/o C_L usando técnicas de biología molecular convencionales. Las secuencias de nucleótidos de los genes de dominio constante de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinto Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. Las moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa pueden entonces expresarse a partir de una célula en la que se han introducido y aislarse el anticuerpo anti-CCR2.

25 **[0132]** Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para expresar de forma recombinante anticuerpos anti-CCR2. Las moléculas de ácido nucleico también se pueden usar para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena única, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, tal como se describe adicionalmente más adelante. Si las moléculas de ácido nucleico derivan de un animal no humano, no transgénico, las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la humanización de anticuerpos, también tal como se describe en el presente documento.

35 **[0133]** En algunos casos, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada de longitud completa o una cadena ligera de longitud completa en los que la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región constante contiene una o más mutaciones en comparación con una secuencia de región constante humana de línea germinal. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una sustitución de aminoácido que mejore una propiedad del anticuerpo, mediante la adición o eliminación de un sitio de glicosilación o que codifica una sustitución que mejora la estabilidad o vida media del anticuerpo. El ácido nucleico puede contener también mutaciones "silenciosas" para añadir o eliminar un sitio de enzima de restricción, por ejemplo para facilitar la clonación del ácido nucleico en un vector de expresión particular.

40 *Vectores*

45 **[0134]** Se proporcionan vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo anti-CCR2 o una parte de unión a antígeno del mismo. También se proporcionan vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos y sondas de los mismos.

50 **[0135]** En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 o partes de unión a antígeno se expresan mediante la inserción de ADN que codifica cadenas pesada y/o ligera parcial o de longitud completa, obtenido tal como se describe en el presente documento, en vectores de expresión de tal manera que los genes se unen operativamente a las secuencias de control de expresión necesarias, tales como secuencias de control de transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de plantas, tales como el virus mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YACs, episomas derivados de EBV, y similares. En algunos casos el gen del anticuerpo se liga en un vector tal que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirven su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. Las secuencias de vector de expresión y control de la expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes).

60

[0136] Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina C_H o C_L humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados de modo que cualquier secuencia de V_H o V_L puede insertarse y expresarse, tal como se describe en el presente documento. En tales vectores, el empalme se produce normalmente entre el sitio donante de empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de empalme que precede al dominio C humano, y también en las regiones de empalme que aparecen dentro de los exones de C_H humanos. La poliadenilación y terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos nativos en dirección 3' de las regiones codificantes. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal se una en marco al extremo amino terminal de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

[0137] Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. Se entenderá por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores, tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), polioma y promotores fuertes de mamíferos, tales como promotores de inmunoglobulina y actina nativos. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales, y secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.168.062, Patente de Estados Unidos No. 4.510.245 y la Patente de Estados Unidos N° 4.968.615. Los procedimientos para expresar anticuerpos en plantas, incluyendo una descripción de los promotores y vectores, así como la transformación de plantas se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.517.529. Los procedimientos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura, también son bien conocidos en la técnica.

[0138] Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células dhfr-huésped con selección/amplificación de metotrexato), el gen neo (para selección de G418), y el gen de la glutamato sintetasa (GS).

Células huésped no hibridoma y procedimientos de producción recombinante de proteínas

[0139] Las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-CCR2 y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar para la transfección de una célula huésped adecuada de mamífero, planta, bacteriana, de insecto o de levadura. La transformación puede ser por cualquier procedimiento conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido o polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa de ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamífero mediante vectores virales. Los procedimientos de transformación de células son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, y 4.959.455). Los procedimientos de transformación de células vegetales son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, transformación mediada por Agrobacterium, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los procedimientos de transformación bacteriana, células de insectos y células de levadura son también bien conocidos en la técnica.

[0140] Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidos en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células NSO, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de hámster neonato (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, y un número de otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan a través de la determinación de qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en

células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de proteínas convencionales. Las células huésped vegetales incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Las células huésped bacterianas incluyen especies de *E. coli* y *Streptomyces*. Las células huésped de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

[0141] Además, la expresión de anticuerpos de líneas celulares de producción puede potenciarse usando un número de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para potenciar la expresión bajo ciertas condiciones. El sistema GS se discute, en general o en parte, en relación con las Patentes Europeas Nos. 216 846, 256 055, 323 997 y 338 841.

[0142] Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferente glicosilación entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento, o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento son parte de la presente descripción, independientemente de la glucosilación de los anticuerpos.

Animales y plantas transgénicas

[0143] Los anticuerpos anti-CCR2 también pueden ser producidos transgénicamente mediante la generación de un mamífero o planta que es transgénico para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir de los mismos. En relación con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos anti-CCR2 pueden ser producidos en, y recuperados de, la leche de cabras, vacas, u otros mamíferos. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172, y 5.741.957. En algunos casos, los animales transgénicos no humanos que comprenden locus de inmunoglobulina humana se inmunizan con CCR2 o una parte inmunogénica del mismo, tal como se describe en el presente documento. Se describen procedimientos para preparar anticuerpos en plantas, por ejemplo, en las patentes US 6,046,037 y 5,959,177.

[0144] En algunos casos, los animales transgénicos no humanos o plantas transgénicas se producen introduciendo una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-CCR2 en el animal o planta por técnicas transgénicas estándar. Ver Hogan y la patente de Estados Unidos 6.417.429, supra. Las células transgénicas usadas para fabricar el animal transgénico pueden ser células madre embrionarias o células somáticas o un óvulo fertilizado. Los organismos transgénicos no humanos pueden ser heterocigotos no quiméricos, quiméricos, y homocigotos no quiméricos. Véase, por ejemplo, Hogan et al, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* Segunda ed, Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al, *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); y Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A laboratory Handbook*, Academic Press (1999). En algunos casos, los animales no humanos transgénicos tienen una alteración dirigida y sustitución por un constructo de reconocimiento que codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de interés. En un caso, los animales transgénicos comprenden y expresan moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras que se unen específicamente a CCR2, y preferiblemente (i) se unen al primer y/o segundo bucles extracelulares de CCR2; (ii) que no se unen al extremo N-terminal o al tercer bucle extracelular de CCR2 o ambos; o (iii) ambos. En un caso, los animales transgénicos comprenden y expresan moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras que se unen específicamente a CCR2 humano. En algunos casos, los animales transgénicos comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo modificado, tal como un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos anti-CCR2 pueden producirse en cualquier animal transgénico. En un caso, los animales no humanos son ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. El animal transgénico no humano expresa dichos polipéptidos codificados en sangre, leche, orina, saliva, lágrimas, moco y otros fluidos corporales.

Bibliotecas de expresión en fagos

[0145] Se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo anti-CCR2 o parte de unión a antígeno del mismo que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fagos, seleccionar la biblioteca con CCR2 o una parte del mismo, aislar fagos que se unen a CCR2, y obtener el anticuerpo a partir del fago. A modo de ejemplo, un procedimiento para la preparación de la biblioteca de anticuerpos para su uso en técnicas de expresión en fagos comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que comprende locus de inmunoglobulina humana con CCR2 o una parte antigénica del mismo para crear una respuesta inmune, extraer células productoras de anticuerpos del animal inmunizado; aislar ARN que codifica las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de las células extraídas, realizar la transcripción inversa del ARN para producir ADNc, amplificar el ADNc usando cebadores, e insertar el ADNc en un vector de expresión de fagos, de manera que los anticuerpos se expresan en el fago. Los anticuerpos anti-CCR2 recombinantes pueden obtenerse de esta manera.

[0146] Los anticuerpos humanos anti-CCR2 recombinantes pueden aislarse mediante el cribado de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante. La biblioteca puede ser una biblioteca de expresión en fagos de scFv, generados usando los ADNc de V_L y V_H humanos preparados a partir de ARNm aislado de células B. Los procedimientos para preparar y cribar dichas bibliotecas se conocen en la técnica. Los kits para generar bibliotecas de expresión en fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el Sistema de Anticuerpos en Fagos Recombinantes de Pharmacia, nº de catálogo 27-9400-01; y el kit de expresión en fagos Stratagene SurfZAP®, catálogo no 240612). Hay también otros procedimientos y reactivos que se pueden utilizar en la generación y selección de bibliotecas de expresión de anticuerpos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.223.409; publicación PCT No. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al, Bio/Technology 9: 1370-1372 (1991); Hay et al, Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85 (1992); Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989); McCafferty et al, Nature 348: 552-554 (1990); Griffiths et al, EMBO J. 12: 725-734 (1993); Hawkins et al., J. Mol Biol 226: 889-896 (1992); Clackson et al, Nature 352: 624-628 (1991); Gram et al, Proc Natl Acad Sci USA. 89: 3.576-3.580 (1992); Garrad et al, Bio/Technology 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom et al, Nuc Acid Res. 19: 4133-4137 (1991); y Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982 (1991).

[0147] En un caso, para aislar y producir anticuerpos anti-CCR2 humanos con las características deseadas, se usa primero un anticuerpo anti-CCR2 humano como se describe en el presente documento para seleccionar secuencias de cadena pesada y ligera humanas que tienen actividad de unión similar hacia CCR2, utilizando procedimientos de imprimación de epítipo descritos en la publicación PCT No. WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos utilizadas en este procedimiento pueden ser bibliotecas de scFv preparadas y seleccionadas, tal como se describe en la Publicación PCT Nº WO 92/01047, McCafferty et al, Nature 348: 552-554 (1990); y Griffiths et al, EMBO J. 12: 725-734 (1993). Las bibliotecas de anticuerpos scFv se pueden cribar usando CCR2 humano como antígeno.

[0148] Una vez que se seleccionan los dominios V_L y V_H humanos iniciales, se realizan experimentos de "mezcla y emparejamiento", en los que diferentes pares de los segmentos V_L y V_H seleccionados inicialmente son examinados para detectar unión a CCR2 para seleccionar las combinaciones de pares preferidos V_L/V_H . Además, para mejorar aún más la calidad del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H de los pares preferidos V_L/V_H pueden mutarse aleatoriamente, preferiblemente dentro de la región CDR3 de V_H y/o V_L , en un proceso análogo al proceso de mutación somática in vivo responsable de la maduración por afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración de la afinidad in vitro puede llevarse a cabo mediante la amplificación de los dominios V_H y V_L usando cebadores de PCR complementarios a la CDR3 de V_H o la CDR3 de V_L , respectivamente, cuyos cebadores han sido "enriquecidos" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones de tal manera que los productos resultantes de PCR codifican los segmentos V_H y V_L en los que se han introducido mutaciones al azar en las regiones CDR3 de V_H y/o V_L . Estos segmentos V_H y V_L mutados aleatoriamente pueden ser reseleccionados para la unión a CCR2.

[0149] Tras el cribado y aislamiento de un anticuerpo anti-CCR2 de una biblioteca de expresión de inmunoglobulinas recombinantes, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado se puede recuperar del paquete de expresión (por ejemplo, del genoma del fago) y se subclonan en otros vectores de expresión mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Si se desea, el ácido nucleico puede además manipularse para crear otras formas de anticuerpo, tal como se describe en el presente documento. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante cribado de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula huésped de mamífero, tal como se describe en el presente documento.

Cambio de clase

[0150] Otro aspecto proporciona un procedimiento para la conversión de la clase o subclase de un anticuerpo anti-CCR2 a otra clase o subclase. En algunos casos, una molécula de ácido nucleico que codifica un V_L o V_H que no incluye secuencias que codifican C_L o C_H se aísla usando procedimientos bien conocidos en la técnica. La molécula de ácido nucleico a continuación se une operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una C_L o C_H de una clase o subclase de inmunoglobulina deseada. Esto se puede lograr utilizando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H , tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CCR2 que era originalmente IgM puede cambiarse de clase a una IgG. Además, el cambio de clase puede usarse para convertir una subclase IgG a otra, por ejemplo de IgG1 o IgG2 a IgG4. Otro procedimiento para producir un anticuerpo que comprende un isotipo deseado comprende las etapas de aislar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CCR2 y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CCR2, aislar la secuencia que codifica la región V_H , ligar la secuencia de V_H con una secuencia que codifica un dominio constante de cadena pesada del isotipo deseado, expresar el gen de cadena ligera y la construcción de cadena pesada en una célula, y recoger el anticuerpo anti-CCR2 con el isotipo deseado.

Anticuerpos desinmunizados

[0151] En otro aspecto, el anticuerpo puede ser desinmunizado para reducir su inmunogenicidad usando las técnicas descritas en, por ejemplo, publicaciones PCT Nos. WO98/52976 y WO00/34317.

Anticuerpos mutados

5

[0152] En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico, vectores y células huésped pueden utilizarse para fabricar anticuerpos anti-CCR2 mutados. Los anticuerpos pueden mutarse en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Las técnicas de mutagénesis dirigida al sitio son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. y Ausubel et al., supra. En otro caso, una o más mutaciones se realizan en un residuo de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en el anticuerpo monoclonal 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P. Las mutaciones pueden realizarse en una región armazón de un dominio variable o en un dominio constante. En un caso, las mutaciones se realizan en un dominio variable. En algunos casos, una o más mutaciones se realizan en un residuo de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en una región armazón de un dominio variable de una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 194 o la SEQ ID NO: 113.

[0153] En otro aspecto, la región armazón está mutada de manera que la región o regiones de marco resultantes tienen la secuencia de aminoácidos del gen de la línea germinal correspondiente. Una mutación puede realizarse en una región armazón o dominio constante para aumentar la vida media del anticuerpo anti-CCR2. Véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO 00/09560. Una mutación en una región armazón o dominio constante también puede hacerse para alterar o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para unión covalente o no covalente a otra molécula, para añadir o eliminar uno o más sitios de glicosilación o alterar propiedades tales como la fijación del complemento, unión a FcR y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCC). Un único anticuerpo puede tener mutaciones en una cualquiera o más de las regiones marco de dominio variable o en el dominio constante.

[0154] En algunos casos, hay de 1 a 8, incluyendo cualquier número entre los mismos, mutaciones de aminoácidos en cualquiera de los dominios V_H o V_L del anticuerpo anti-CCR2 mutado en comparación con el anticuerpo anti-CCR2 antes de la mutación. Además, cualquiera de las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunos casos, no hay más de 5, 4, 3, 2, o 1 cambio de aminoácido en los dominios constantes.

30

Anticuerpos modificados

[0155] En otro aspecto, se puede producir un anticuerpo de fusión o inmunoadesina que comprende la totalidad o una parte de un anticuerpo anti-CCR2 unido a otro polipéptido. En un caso, sólo los dominios variables del anticuerpo anti-CCR2 están unidos al polipéptido. En otro caso, el dominio V_H de un anticuerpo anti-CCR2 está unido a un primer polipéptido, mientras que el dominio V_L de un anticuerpo anti-CCR2 está unido a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de una manera tal que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí para formar un sitio de unión al antígeno. En otro caso, el dominio V_H está separado del dominio V_L por un enlazador de tal manera que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí (véase más adelante en anticuerpos de cadena única). El anticuerpo V_H -enlazador- V_L se une entonces al polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o tejido que expresan CCR2. El polipéptido puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, quimioquina u otra proteína reguladora, o puede ser un agente de diagnóstico, tal como una enzima que pueda ser fácilmente visualizada, tal como peroxidasa de rábano picante. Además, los anticuerpos de fusión se pueden crear en la que dos (o más) anticuerpos de cadena única están unidos entre sí. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una única cadena polipeptídica, o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

45

[0156] Para crear un anticuerpo de cadena única (scFv), los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, de tal manera que las secuencias de V_H y V_L pueden expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con los dominios V_L y V_H unidos por el enlazador flexible. Véase, por ejemplo, Bird et al, Science 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5879-5883 (1988); McCafferty et al, Nature 348: 552-554 (1990). El anticuerpo de cadena única puede ser monovalente, si sólo se utilizan un único V_H y V_L , bivalente, si se utilizan dos V_L y V_H , o polivalente, si se utilizan más de dos V_L y V_H . Los anticuerpos biespecíficos o polivalentes se pueden generar para que se unan específicamente a CCR2 y a otra molécula.

55

[0157] En otro aspecto, se pueden preparar otros anticuerpos modificados usando moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-CCR2. Por ejemplo, se pueden preparar "cuerpos Kappa" (Ill et al, Protein Eng. 10: 949-57 (1997)) (Martin et al, EMBO J. 13: 5303-9 (1994)), "minicuerpos", "diacuerpos" (Holliger et al, Proc Natl Acad Sci USA. 90: 6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Traunecker et al, EMBO J. 10: 3655-3659 (1991) y Traunecker et al., Int J. Cancer

60

(Suppl.) 7: 51-52 (1992)) usando técnicas de biología molecular convencionales siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

5 **[0158]** Los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno se pueden producir por una variedad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al, J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992). Además, los anticuerpos biespecíficos se pueden formar como "diacuerpos" o "Janusinas." En algunos casos, el anticuerpo biespecífico se une a dos epítomos diferentes de CCR2. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena pesada y una primera cadena ligera de anticuerpo monoclonal 4.40, 4.9 o 4.40 A68G S230P y una cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo adicionales. En algunos casos, la cadena ligera y la cadena pesada adicionales también son de uno de los anticuerpos monoclonales identificados anteriormente, pero son diferentes de las primeras cadenas pesadas y ligeras.

10 **[0159]** En algunos casos, los anticuerpos modificados descritos en el presente documento se preparan utilizando uno o más de los dominios variables o CDR de un anticuerpo monoclonal anti-CCR2 humano proporcionado en el presente documento.

Anticuerpos derivatizados y marcados

20 **[0160]** Un anticuerpo anti-CCR2 o parte de unión a antígeno se puede derivatizar o unir a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o parte de éstos, se derivatizan de manera que la unión a CCR2 no se ve afectada adversamente por la derivatización o el etiquetado. Por consiguiente, los anticuerpos y partes de anticuerpo pretenden incluir formas tanto intactas como modificadas de los anticuerpos anti-CCR2 humanos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo o parte de anticuerpo puede estar ligado funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

25 **[0161]** Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce mediante reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncional (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Tales enlazadores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

30 **[0162]** Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Los agentes de detección útiles con los que un anticuerpo o parte de unión a antígeno se pueden derivatizar incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, fósforos lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tales como la peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se marca con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción que puede discernirse Por ejemplo, cuando el agente de peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina, y detectarse a través de medición indirecta de la avidina o la unión a estreptavidina. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítomo de polipéptido predeterminado reconocido por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítomo). En algunos casos, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento estérico.

35 **[0163]** Un anticuerpo anti-CCR2 puede también marcarse con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede usarse tanto para fines diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador puede usarse para detectar tumores que expresan CCR2 mediante técnicas de diagnóstico de rayos X u otras técnicas. Además, el radiomarcador puede usarse terapéuticamente como toxina para células cancerosas o tumores. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionúclidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I y ^{131}I .

40 **[0164]** Un anticuerpo anti-CCR2 también puede derivatizarse con un grupo químico, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la vida media en suero o para aumentar la unión a tejidos.

45 **[0165]** En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 puede marcarse con un ion o resto paramagnético, radiactivo o fluorogénico que es detectable en imágenes.

[0166] En algunos casos, el ion paramagnético es cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) o erbio (III). En otros casos, el ion radiactivo es yodo 123, tecnecio 99, indio 111, renio 188, renio 186, cobre 67, yodo 131, itrio 90, yodo 125, astatina 211 y galio 67. En otros casos, el anticuerpo anti-CCR2 está marcado con un agente de formación de imágenes de rayos X, tales como lantano (III), oro (III), plomo (II) y bismuto (III).

Composiciones farmacéuticas y kits

[0167] Se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo anti-CCR2 humano con propiedades antagonistas. Tales composiciones son útiles para tratar una afección en la que CCR2 tiene un papel, incluyendo, pero no limitado a, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, psoriasis; trastornos inflamatorios, trastornos alérgicos, enfermedades autoinmunes, trastornos de rechazo de injerto, aterosclerosis, obesidad, infección por VIH, dolor neuropático, inflamación asociada con isquemia, estenosis y reestenosis, cáncer, sepsis, escleroderma, y diabetes. En algunos casos, el tratamiento es de la fibrosis hepática mediada por virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), y/o esteatohepatitis inducida por alcohol (ASH). En algunos casos, el sujeto está en necesidad de una reducción de la infiltración de leucocitos en los tejidos, tales como tejidos que son los sitios de las respuestas inflamatorias. En algunos casos, el sujeto de tratamiento es un humano. En otros casos, el sujeto es un sujeto veterinario. Los ejemplos de tejidos en necesidad de disminución de la inflamación o infiltración reducida de leucocitos incluyen, pero no se limitan a, tejido conjuntivo, cartílago, hígado, pulmón, riñón, tejido neural, incluyendo cerebro, médula espinal y tejido neural periférico, corazón, vasos sanguíneos, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, colon, próstata, páncreas, tracto urinario, ovarios, pecho, útero, testículos, pene, hueso, músculo, glándula tiroides, glándula adrenal, pituitaria, tejido adiposo, médula ósea, sangre, timo, bazo, ganglios linfáticos, piel, ojo, oído o nariz. En un caso, los tejidos son tejidos que tienen superficies mucosas.

[0168] Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" significa cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables simplemente a modo de ilustración, son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o eficacia del anticuerpo.

[0169] Las composiciones pueden estar en una variedad de formas, por ejemplo, formas de dosificación líquida, semi-sólida y sólida, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones típicas están en forma de soluciones inyectables o perfundible, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de seres humanos. El modo preferido de administración es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En un caso, el anticuerpo se administra mediante perfusión o inyección intravenosa. En otro caso, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

[0170] Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el anticuerpo anti-CCR2 en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0171] Los anticuerpos se pueden administrar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferida es subcutánea, intramuscular, o perfusión

intravenosa. Como se entenderá por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Otros modos de administración incluyen intraperitoneal, intrabronquial, transmucosa, intraespinal, intrasnovial, intraaórtico, intranasal, ocular, ótica, tópica y bucal, e intratumoral.

5 **[0172]** En ciertos casos, el compuesto activo de las composiciones de anticuerpo pueden prepararse con un portador que protegerá el anticuerpo contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente
10 conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained adn Controlled Release Drug Delivery Systems (J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

[0173] Los compuestos activos adicionales también pueden ser incorporados en las composiciones. En ciertos casos, un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es coformulado y/o coadministrado con uno o más agentes terapéuticos, de diagnóstico o
15 profilácticos adicionales. Los agentes terapéuticos incluyen, sin limitación, un anticuerpo anti-CCR2 con una especificidad fina diferente, anticuerpos que se unen a otras dianas, fotosensibilizadores, andrógenos, estrógenos, agentes antiinflamatorios no esteroides, agentes antihipertensivos, agentes analgésicos, antidepresivos, antibióticos, agentes anticáncer, anestésicos, antieméticos, antiinfectantes, anticonceptivos, agentes antidiabéticos, esteroides, agentes antialérgicos, agentes quimioterapéuticos, agentes antimigraña, agentes para dejar de fumar, agentes antivirales,
20 inmunosupresores, agente trombolítico, agente reductor del colesterol y agentes antiobesidad.

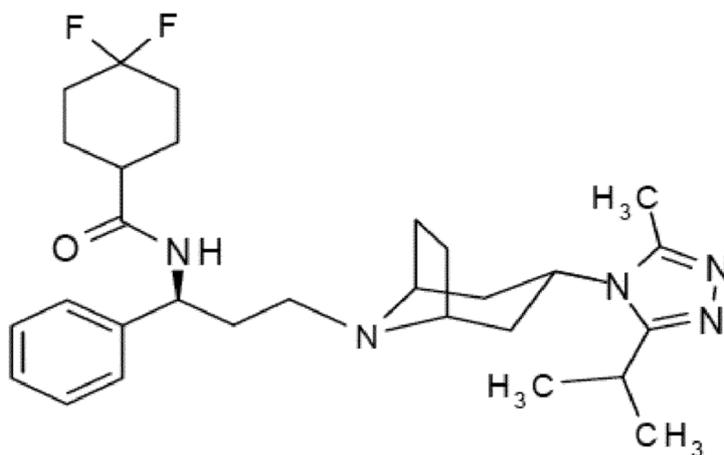
[0174] Los agentes terapéuticos también incluyen análogos de péptidos que inhiben CCR2, anticuerpos u otras moléculas que se unen a MCP-1, MCP-2, MCP-3 o MCP-4 y evitan su unión a CCR2, y agentes que inhiben la expresión de CCR2. En un caso, los agentes adicionales que inhiben la expresión de CCR2 comprenden un ácido nucleico antisentido capaz de
25 hibridarse con un ARNm de CCR2, tal como una horquilla de ARN o siRNA. Los ácidos nucleicos específicos de secuencia capaces de inhibir la función del gen por interferencia de ARN son bien conocidos en la técnica. Tales terapias de combinación pueden requerir dosis menores del anticuerpo anti-CCR2 inhibidor, así como de los agentes coadministrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

[0175] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente antimicrobiano. Los agentes antimicrobianos incluyen antibióticos (por
30 ejemplo, antibacteriano), agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes antiprotozoarios. Los ejemplos no limitativos de agentes antimicrobianos son las sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas, penicilinas y las cefalosporinas.

[0176] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor y un antagonista de quimioquina, un antagonista de CCR2, un antagonista de MCP-1 o un
35 antagonista de CCR5. El antagonista de CCR2 o un antagonista de MCP-1 incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos dirigidos a MCP-1 (Patente de Estados Unidos 7.202.343, US2005/0025768, US2006/0039913, US2006/0246069, y US2004/004/0047860); compuestos tetrahidropiranyl ciclopentil bencilamida (US2006/0116421); compuestos heterorarilpiperidina (US2005/0250781); compuestos de piperidinil ciclopentil aril bencilamida (US2006/0173013); compuestos de amina cíclicos (Patente de Estados Unidos 6.140.349 y Patente de Estados Unidos
40 6.476.054); compuestos de ciclopentilo (US2002/0049222 y Patente de Estados Unidos 6.545.023); compuestos de tetrahidropiranyl ciclopentil tetrahidropiridopiperidina (US2004/0167156, patente de Estados Unidos 6.812.234 y patente de Estados Unidos 7.230.008); compuestos de heterotriciclicamida fusionados a aminociclopentilo (US2007/0004714); compuestos de piperidinil-alfa-aminoamida (US2005/0250814); compuestos de pirazol sustituidos (WO06/88813); compuestos de tetrahidropiranyl ciclopentil amida heterocíclicos (US2006/0178363); compuestos heterocíclicos de ciclopentil bencilamida de 7 y 8 miembros (US2006/0183731); compuestos de benzoxazinil-
45 amidociclopentil-heterocíclico (US2006/0069088); compuestos de 3-aminociclopentanocarboxamida (US2007/0149532); compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno (US2007/0155713); compuestos de triazolil fenil bencenosulfonamida (WO08/10934); derivados pirrolidina sustituidos (US2004/0186140); benzamida sustituida y derivados de fenilcarbamato sustituidos (Patente de Estados Unidos 7.087.604); compuestos de cicloalquilamina sustituidos (US2005/0054626); compuestos de bicicloalquilamina sustituidos (US2005/0227960); compuestos de pirrolidinona y pirrolidina-tiona (US2003/0149081, patente de Estados Unidos 6.727.275 y patente de Estados Unidos
50 6.936.633); compuestos de mercaptoimidazol (US2007/0244138); compuestos de dipiperidina sustituidos (US2007/0197590); compuestos de sales cuaternarias sustituidas con fenilamino (US2006/0293379); heterociclos de nitrógeno bicíclicos y puenteados (US2006/0074121); compuestos de 3-aminociclopentanocarboxamida (US2006/0020133); compuestos de 3-(4-heteroarilciclohexilamino)ciclopentanocarboxamida (US2005/0267146); compuestos de triazol (patente de Estados Unidos 6.492.364); compuestos de heteroaril sulfonamida (US2006/0173019); aril sulfonamidas (patente de Estados Unidos 6.939.885); bis-aril sulfonamidas (patente de Estados Unidos
60 7.227.035 y US2004/0167113); compuestos de benzamida sustituida (patente de Estados Unidos 6.821.964); compuestos de diazepam sustituido (US2007/0249589); derivados de triazaespiro [5.5] undecano

(US2005/267114); compuestos de piperidinacarboxamida sustituida (US2003/0114443 y US6,562,978); derivados de benzazepina (US2004/0235822 y Patente de Estados Unidos 7.262.185).

[0177] En casos seleccionados, el antagonista de quimioquina coformulado o coadministrado con los anticuerpos CCR2 es SELZENTRY® (maraviroc), que se describe químicamente como 4,4-difluoro-N-((1S)-3-[exo-3-(3-isopropil-5-metil-4H-1,2,4-triazol-4-il)-8-azabicyclo [3.2.1]oct-8-il]-1-fenilpropil)ciclohexanocarboxamida:



[0178] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un antagonista del receptor CB-1. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "receptor de CB-1" se refiere a un receptor de cannabinoides de tipo 1 acoplado a proteína G. El término "antagonista" incluye tanto los antagonistas completos como antagonistas parciales, así como agonistas inversos. El antagonista del receptor CB-1 puede ser selectivo para el receptor de CB-1. "selectivo del receptor de CB-1" significa que el compuesto tiene poca o ninguna actividad para antagonizar el receptor cannabinoide-2 (CB-2). El antagonista de CB-1 puede ser al menos aproximadamente 10 veces más selectivo para el receptor de CB-1 en comparación con el receptor de CB-2. Por ejemplo, la concentración inhibitoria (IC50) para antagonizar el receptor de CB-1 es de aproximadamente 10 o más veces menor que la IC50 para antagonizar el receptor CB-2. Los antagonistas del receptor de CB-1 adecuados incluyen los compuestos descritos en las patentes de Estados Unidos N° 5.462.960; 5.596.106; 5.624.941; 5.747.524; 6.017.919; 6.028.084; 6.432.984; 6.476.060; 6.479.479; 6.518.264; y 6.566.356; publicación de patentes de Estados Unidos N° 2003/0114495; 2004/0077650; 2004/0092520; 2004/0122074; 2004/0157838; 2004/0157839; 2004/0214837; 2004/0214838; 2004/0214855; 2004/0214856; 2004/0058820; 2004/0235926; 2004/0259887; 2005/0080087; 2005/0026983 y 2005/0101592; publicación de Patente PCT N° WO 03/075660.; WO 02/076949; WO 01/029007; WO 04/048317; WO 04/058145; WO 04/029204; WO 04/012671; WO 03/087037; WO 03/086288; WO 03/082191; WO 03/082190; WO 03/063781; WO 04/012671; WO 04/013120; WO 05/020988; WO 05/039550; WO 05/044785; WO 05/044822; y WO 05/049615: la solicitud de patente PCT n° de serie PCT/IB2004/004050 presentada el 6 de diciembre de 2004; PCT/IB2004/004017 presentada el 6 de diciembre de 2004; PCT/IB2004/004023 presentada el 6 de diciembre de 2004; y PCT/IB2004/004019 presentada el 6 de diciembre de 2004; y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/523937 presentada el 21 de noviembre de 2003; 60/529908 presentada el 16 de diciembre de 2003; 60/529909 presentada el 16 de diciembre de 2003; 60/529910 presentada el 16 de diciembre de 2003; 60/530012 presentada el 16 de diciembre de 2003; y 60/564648 presentada el 21 de abril de 2004. Los antagonistas de receptor de CB-1 preferidos para uso en los procedimientos incluyen: rimonabant (SR141716A también conocido bajo el nombre comercial Acomplia® está disponible de Sanofi-Synthelabo o se puede preparar tal como se describe en Patente de Estados Unidos No. 5.624.941; N-(piperidin-1-il)-1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-yodofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (AM251) está disponible de Tocris®, Ellsville, MO; [5-(4-bromofenil)-1-(2,4-dicloro-fenil)-4-etil-N-(1-piperidinil)-1H-pirazol-3-carboxamida] (SR147778) que se puede preparar tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.645.985; N-(piperidin-1-il)-4,5-difenil-1-metilimidazol-2-carboxamida, N-(piperidin-1-il)-4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, N-(piperidin-1-il)-4,5-di-(4-metilfenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, N-(ciclohexil)-4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, y N-(fenil)-4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida que se puede preparar tal como se describe en la Publicación de Patente PCT No. WO 03/075660; el clorhidrato, mesilato y sal de besilato de ácido 1-[9-(4-clorofenil)-8-(2-clorofenil)-9H-purin-6-il]-4-etilamino-4-carboxílico que puede prepararse tal como se describe en la publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0092520; amida del ácido 1-[7-(2-cloro-fenil)-8-(4-cloro-fenil)-2-metil-pirazolo[1,5-a] [1,3,5] triazin-4-il]-3-etilamino-azetidina-3-carboxílico, y amida de ácido 1-[7-(2-cloro-fenil)-8-(4-cloro-fenil)-2-metil-pirazolo [1,5-a] [1,3,5] triazin-4-il]-3-metilamino-azetidina-3-carboxílico que se puede preparar tal como se describe

en la publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0157839 (4-cloro-fenil)-2-(2-cloro-fenil)-6-(2,2-difluoro-propil) 2,4,5,6-tetrahidro-pirazolo [3,4-c]piridin-7-ona, 2-(2-cloro-fenil)-3-(4-etil-fenil)-5-(2,2,2-trifluoro-etil)-4,5-dihidro-2H-pirrolo [3,4-c] pirazol-6-ona, y 2-(2-cloro-fenil)-3-(4-isopropil-fenil)-5-(2,2,2-trifluoro-etil)-4,5 dihidro-2H-pirrolo [3,4-c] pirazol-6-ona que se puede preparar tal como se describe en la publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0214855; 3-(4-cloro-fenil)-2-(2-cloro-fenil)-7-(2,2-difluoro-propil)-6,7-dihidro-2H,5H-4-oxa-1,2,7-triaza-azulen-8-ona que se puede preparar tal como se describe en la publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/0101592; 2-(2-cloro-fenil)-6-(2,2,2-trifluoro-etil) -3-(4-trifluorometil-fenil)-2,6-dihidro-pirazolo [4,3-d]pirimidin-7-ona que se puede preparar tal como se describe en la publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0214838; (S)-4-cloro-N-([3-(4-cloro-fenil)-4-fenil-4,5-dihidro-pirazol-1-il]metilamino-metilen)-bencenosulfonamida (SLV-319) y (S)-N-([3-(4-cloro-fenil)-4-fenil-4,5-dihidro-pirazol-1-il] metilamino-metilen)-4-trifluorometil-bencenosulfonamida (SLV-326) que puede ser preparado tal como se describe en la publicación de Patente PCT N° WO 02/076949; N-piperidino-5-(4-bromofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-etilpirazol-3-carboxamida que se puede preparar tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.432.984; 1-[bis-(4-cloro-fenil)-metil]-3-[(3,5-difluoro-fenil)metanosulfonylamino metileno]azetidina que se puede preparar tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.518.264; 2-(5-(trifluorometil)piridin-2-iloxi)-N-(4-(4-clorofenil)-3-(3-cianofenil)butan-2-il)-2-metilpropanamida que se puede preparar tal como se describe en publicación de Patente PCT N° WO 04/048317; 4-[[6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-1-benzofuran-3-il]carbonil]benzocarbonitrilo (LY-320135) que se puede preparar tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.747.524; 1-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(4-fluorofenil)benzo[1,3]dioxol-5-sulfonil] piperidina que se puede preparar tal como se describe en el documento WO 04/013120; y [3-amino-5-(4-clorofenil)-6-(2,4-diclorofenil) furo[2,3-b] piridin-2-il]-fenil-metanona que puede prepararse tal como se describe en el documento WO 04/012671.

[0179] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un factor angiogénico. Los factores angiogénicos incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento endotelial vascular, angiogenina, factor de crecimiento transformante alfa y factor de necrosis tumoral beta, angiopoyetina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento de hepatocitos y proliferina.

[0180] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente trombolítico. Los agentes trombolíticos incluyen, pero no se limitan a, activador de plasminógeno uroquinasa, uroquinasa, estreptoquinasa, inhibidores de inhibidor de alfa 2-plasmina, e inhibidores de inhibidor-1 del activador del plasminógeno, enzima convertidora de angiotensina (ACE), espironolactona, activador del plasminógeno tisular (tPA), un inhibidor de la enzima convertidora de interleuquina 1 beta, anti-trombina III, y similares.

[0181] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente anti-obesidad. Los agentes anti-obesidad incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor de la apo-B/MTP, un inhibidor de 11beta-hidroxi esteroide deshidrogenasa-1, péptido YY₃₋₃₆ o un análogo del mismo, un agonista de MCR-4, un agonista de CCK-A, un inhibidor de la recaptación de monoamina, un agente simpaticomimético, un agonista del receptor adrenérgico β_3 , un agonista de dopamina, un análogo de receptor de la hormona estimulante de melanocitos, un agonista del receptor 5-HT_{2C}, un antagonista de la hormona concentradora de melanina, la leptina, un análogo de leptina, un agonista del receptor de leptina, un antagonista de galanina, un inhibidor de lipasa, un agonista de bombesina, un antagonista del receptor del neuropéptido-Y, un agente tiromimético, deshidroepiandrosterona o un análogo de la misma, un antagonista del receptor de glucocorticoides, un antagonista del receptor de orexina, un agonista del receptor de péptido-1 de tipo glucagón, un factor neurotrófico ciliar, un antagonista de la proteína relacionada con agouti humano, un antagonista del receptor de la grelina, un antagonista o un agonista inverso del receptor de la histamina 3, y un agonista del receptor de neuromedina U.

[0182] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados con y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente que inhibe el reclutamiento y/o adhesión de los neutrófilos y/o células mononucleares a un sitio de la lesión vascular. Tales agentes terapéuticos pueden, por ejemplo, inhibir la actividad (por ejemplo, actividad de unión, actividad de señalización) de una molécula de la superficie celular a través de la cual están mediadas la adhesión celular, la quimiotaxis y/o mecanismo direccional ("homing"). Por ejemplo, los antagonistas de moléculas de adhesión celular (por ejemplo, integrinas (por ejemplo, integrinas β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , β_5 , β_6 , β_7 , β_8), selectinas (por ejemplo, E-selectina, P-selectina, L-selectina), cadherinas (por ejemplo, E-, P-, N-cadherinas) y moléculas de adhesión de la superfamilia de la inmunoglobulina (por ejemplo, LFA-2, LFA-3, CD44)) y antagonistas de receptores de citoquinas (por ejemplo, antagonistas de la función del receptor de quimioquinas) pueden coformularse con y/o coadministrarse con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor. Además, los agentes que se unen a ligandos de moléculas de adhesión celular o citoquinas o quimioquinas e inhiben la unión de ligando a receptores expresados en los neutrófilos y/o células mononucleares pueden también ser coformulados con y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor.

[0183] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente terapéutico cardíaco. Los agentes terapéuticos de ejemplo destinados al

tratamiento de trastornos cardíacos incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento, agentes angiogénicos, bloqueantes de canales de calcio, agentes antihipertensivos, agentes inotrópicos, agentes antiaterogénicos, anticoagulantes, beta-bloqueantes, agentes antiarrítmicos, glucósidos cardíacos, agentes antiinflamatorios, antibióticos, agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes que inhiben las infecciones por protozoos y agentes antineoplásicos.

5

[0184] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos cardíacos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un bloqueante de canales de calcio. Los bloqueantes de canales de calcio incluyen, pero no se limitan a, dihidropiridinas, tales como nifedipina, nicardipina, nimodipina, y similares; benzotiazepinas, tales como diltiazem; fenilalquilaminas, tales como verapamilo; éteres de diarilaminopropilamina, tales como bepridil; y tetralinas sustituidas con benzimidol, tales como mibefradil.

10

[0185] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos cardíacos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente antihipertensivo. Los agentes antihipertensivos incluyen, pero no se limitan a, diuréticos, incluyendo las tiazidas, tales como hidroclorotiazida, furosemida, espironolactona, triamtereno, y amilorida; agentes antiadrenérgicos, incluyendo clonidina, guanabenz, guanfacina, metildopa, trimetafán, reserpina, guanetidina, guanadrel, fentolamina, fenoxibenzamina, prazosina, terazosina, doxazosina, propranolol, metoprolol, nadolol, atenolol, timolol, betaxolol, carteolol, pindolol, acebutolol, labetalol; vasodilatadores, incluyendo hidralizina, minoxidil, diazóxido, nitroprusiato; e inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, incluyendo captopril, benazepril, enalapril, enalaprilato, fosinopril, lisinopril, quinapril, ramipril; antagonistas de los receptores de la angiotensina, tales como losartan; y antagonistas de los canales de calcio, incluyendo nifedina, amlodipina, felodipina XL, isadipina, nicardipina, benzotiazepinas (por ejemplo, diltiazem), y fenilalquilaminas (por ejemplo, verapamilo).

15

20

[0186] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un anticoagulante. Los anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, heparina, warfarina, hirudina, péptido anticoagulante tick, heparinas de bajo peso molecular, tal como enoxaparina, dalteparina, y ardeparina, ticlopidina, danaparoid, argatroban, abciximab y tirofiban.

25

[0187] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos cardíacos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente antiarrítmico. Los agentes antiarrítmicos incluyen, pero no se limitan a, los bloqueantes de canales de sodio (por ejemplo, lidocaína, procainamida, encainida, flecainida, y similares), beta bloqueantes adrenérgicos (por ejemplo, propranolol), prolongadores de la duración potencial de acción (por ejemplo, amiodarona), y bloqueantes de canales de calcio (por ejemplo, verapamilo, diltiazem, cloruro de níquel, y similares). También es de interés el suministro de depresores cardíacos (por ejemplo, lidocaína), estimulantes cardíacos (por ejemplo, isoproterenol, dopamina, norepinefrina, etc.), y combinaciones de agentes cardíacos múltiples (por ejemplo, digoxina/quinidina para tratar la fibrilación auricular).

30

35

[0188] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos cardíacos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva. Los agentes para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva incluyen, pero no se limitan a, un glicósido cardíaco, agentes inotrópicos, un diurético de bucle extracelular, un diurético tiazida, un diurético moderador de iones potasio, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un antagonista del receptor de angiotensina, un vasodilatador nitro, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un vasodilatador directo, un antagonista del receptor α 1-adrenérgico, un bloqueante de los canales de calcio, y un agente simpaticomimético.

40

[0189] En determinados casos, el agente o agentes terapéuticos que son coformulados y/o coadministrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente adecuado para el tratamiento de cardiomiopatías, tales como, pero no limitado a, la dopamina, epinefrina, norepinefrina y fenilefrina.

45

[0190] También se incluyen composiciones para inhibir la infección viral, y en particular la infección por VIH, en un mamífero que comprende una cantidad de un anticuerpo en combinación con una cantidad de un agente antiviral, en el que las cantidades del anticuerpo anti-CCR2 y de antiviral agente son juntas eficaces en la inhibición de la replicación viral, la infección viral de células nuevas o cargas virales. Muchos agentes antivirales son conocidos actualmente en la técnica, incluyendo los análogos de nucleósidos (por ejemplo, AZT, 3TC, y ddI), inhibidores de la proteasa y antagonistas de receptores de quimioquinas pueden inhibir la infección por VIH, pero no infecciones virales.

50

55

[0191] En otro aspecto, el anticuerpo anti-CCR2 o fragmento del mismo puede coadministrarse con otros agentes terapéuticos, tales como fármacos o moléculas antiinflamatorios, a un paciente que tiene un trastorno inflamatorio, tal como la artritis, la aterosclerosis o la esclerosis múltiple. En un aspecto, se proporcionan procedimientos para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto en combinación con un agente antiinflamatorio. Los agentes antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, cualquier agente antiinflamatorio no esteroideo conocido, tal como derivados de ácido salicílico (aspirina),

60

derivados de para-aminofenol (acetaminofeno), ácidos indol e indeno acéticos (indometacina), ácidos heteroaril acéticos (ketorolac), ácidos arilpropiónicos (ibuprofeno), ácidos antranílicos (ácido mefenámico), ácidos enólicos (oxicams) y alcanonas (nabumetona) y cualquier agente antiinflamatorio esteroide conocido que incluye corticosteroides y análogos sintéticos biológicamente activos con respecto a sus actividades relativas de glucocorticoides (metabólico) y mineralocorticoide (regulación de electrolitos). En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 se administra en combinación con un fármaco no esteroide antiinflamatorio, tal como la aspirina (Bayer, Bufferin), ibuprofeno (Motrin, Advil), naproxeno sódico (Aleve), ketoprofeno (Orudis KT), indometacina (Indocin), etodolaco (Lodine), diclofenaco sódico (Voltaren), rofecoxib (Vioxx), celecoxib (Celebrex), nabumetona (Relafen) o en combinación con un esteroide, como prednisona, prednisolona, dexametasona, beclometasona, budesonida, fluticasona o triamcinolona.

[0192] Adicionalmente, otros medicamentos utilizados en la terapia de la inflamación incluyen, pero no se limitan a, antagonistas, tales como todos los antagonistas de receptores de histamina y la bradiquinina, antagonistas de receptores de leucotrienos y prostaglandinas, y antagonistas del receptor de factor activante de plaquetas. Todavía en otro caso, el anticuerpo o terapia de combinación se administra junto con radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, cirugía u otro tratamiento de inmunoterapia es decir, terapia de reconocimiento del sistema inmunitario. En otro caso, el anticuerpo se administrará con otro anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CCR2 se puede administrar con un anticuerpo u otro agente que se sabe que inhibe la inflamación, por ejemplo, un anticuerpo o agente que inhibe la integrina alfa-4 (US2004/0009169) o receptor de IL-8 (US2004/0037830). Los anticuerpos adicionales que se pueden coadministrar con los anticuerpos anti-CCR2 se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 6,6965,50; 6.406.865; 6.352.832; y 6.084.075.

[0193] Las composiciones pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o parte de unión a antígeno. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo son sobrepasados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0194] Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación está dictada por y depende directamente de (a) alcanzar las características únicas del anticuerpo anti-CCR2 o parte del mismo y el efecto terapéutico o profiláctico en particular, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la combinación de dicho anticuerpo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

[0195] Un intervalo no limitativo de ejemplo para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o parte de anticuerpo es de 0,025 a 50 mg/kg, 0,1 a 50 mg/kg, 0,1 a 25, 0,1 a 10 o 0,1 a 3 mg/kg. En un caso, el anticuerpo se administra en una formulación en forma de solución acuosa estéril que tiene un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y que comprende de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml de anticuerpo, de aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 100 milimolar de tampón histidina, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80 o polisorbato 20, de aproximadamente 100 milimolar a aproximadamente 400 milimolar de un azúcar no reductor seleccionado de, pero no limitado a, trehalosa o sacarosa, de aproximadamente 0,01 milimolar a aproximadamente 1,0 milimolar de EDTA disódico dihidratado y opcionalmente comprenden un antioxidante farmacéuticamente aceptable, además de un agente quelante. Los antioxidantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, metionina, tiosulfato de sodio, catalasa, y platino. Por ejemplo, la composición puede contener metionina en una concentración que varía de 1 mM a aproximadamente 100 mM, y, en particular, es de aproximadamente 27 mM. En algunos casos, una formulación contiene 5 mg/ml de anticuerpo en un tampón de citrato de sodio 20 mM, pH 5,5, NaCl 140 mM, y 0,2 mg/ml de polisorbato 80. Cabe indicar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse en el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra

o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en el presente documento son solo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada.

5 **[0196]** Otro aspecto proporciona kits que comprenden un anticuerpo anti-CCR2, o parte de unión a antígeno, o una composición que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Un kit puede incluir, además del anticuerpo o composición, agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones para su uso en un procedimiento de diagnóstico o terapéutico, así como material de envasado, tales como, pero no limitado a, hielo, hielo seco, STYROFOAM®, espuma, plástico, celofán, plástico de embalar, plástico de burbujas, cartón y cacahuetes de almidón. En un caso, el kit incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y un agente de diagnóstico que puede ser utilizado en un procedimiento descrito en el presente documento. En otro caso, el kit incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y uno o más agentes terapéuticos que pueden ser utilizados en un procedimiento descrito en el presente documento.

15 **[0197]** Se proporcionan composiciones y kits para inhibir el cáncer en un mamífero que comprende una cantidad de un anticuerpo en combinación con una cantidad de un agente quimioterapéutico, en el que las cantidades del compuesto, sal, solvato, o profármaco, y del agente quimioterapéutico son conjuntamente eficaces en la inhibición de crecimiento celular anormal. Muchos agentes quimioterapéuticos se conocen actualmente en la técnica. En algunos casos, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores de quimioquinas, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de la topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas, por ejemplo, los antiandrógenos, y agentes antiangiogénesis.

Procedimientos de diagnóstico de uso

25 **[0198]** En otro aspecto, se proporcionan procedimientos de diagnóstico. Los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar CCR2 en una muestra biológica in vitro o in vivo. En un caso, se proporciona un procedimiento para diagnosticar la presencia o localización de células que expresan CCR2 en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende las etapas de inyectar el anticuerpo en el sujeto, determinar la expresión de CCR2 en el sujeto mediante la localización donde el anticuerpo se ha unido, comparar la expresión en el sujeto con la de un sujeto de referencia normal o estándar, y diagnosticar la presencia o localización de las células. Los anticuerpos anti-CCR2 también se pueden usar como un marcador para la inflamación y/o para la infiltración de células inmunitarias, tales como monocitos, en un tejido.

35 **[0199]** Los anticuerpos anti-CCR2 se pueden usar en un inmunoensayo convencional, incluyendo, sin limitación, un ELISA, un RIA, citometría de flujo, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia Western o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar CCR2 de humanos. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar CCR2 de monos cynomolgus o monos rhesus. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar CCR2 de roedores, tales como ratones y ratas.

40 **[0200]** También se proporciona un procedimiento para detectar CCR2 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CCR2 y detectar el anticuerpo unido. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 está marcado directamente con un marcador detectable. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 (el primer anticuerpo) no está marcado y un segundo anticuerpo u otra molécula que se puede unir el anticuerpo anti-CCR2 está marcado. Como es bien conocido para un experto en la técnica, se elige un segundo anticuerpo que sea capaz de unirse específicamente a la especie en particular y la clase del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-CCR2 es una IgG humana, entonces el anticuerpo secundario puede ser un anti-IgG humana. Otras moléculas que pueden unirse a anticuerpos incluyen, sin limitación, Proteína A y Proteína G, ambas de las cuales están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Pierce Chemical Co.

45 **[0201]** Los marcadores adecuados para el anticuerpo o el anticuerpo secundario se han descrito supra, e incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, galactosidasa beta, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

50 **[0202]** En otros casos, CCR2 puede ensayarse en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competición utilizando patrones de CCR2 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-CCR2 no marcado. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de CCR2 marcados y el anticuerpo anti-CCR2 se combinan y se determina la cantidad de patrón de CCR2 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de CCR2 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de CCR2 marcado unido al anticuerpo anti-CCR2.

5 **[0203]** Se pueden usar los inmunoensayos descritos anteriormente para un número de propósitos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar CCR2 en células cultivadas. En un caso, los anticuerpos anti-CCR2 se utilizan para determinar la cantidad de CCR2 en la superficie de las células que han sido tratadas con diversos compuestos. Este procedimiento se puede utilizar para identificar compuestos que modulan los niveles de proteína CCR2. Según este procedimiento, una muestra de células se trata con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo mientras que otra muestra se deja sin tratar. Si se mide la expresión total de CCR2, las células se lisan y la expresión total de CCR2 se mide usando uno de los inmunoensayos descritos en el presente documento. La expresión total de CCR2 en las células tratadas frente a las células no tratadas se compara para determinar el efecto del compuesto de ensayo.

15 **[0204]** Un inmunoensayo preferido para medir la expresión total de CCR2 es la citometría de flujo o inmunohistoquímica. Si se mide la expresión de CCR2 de la superficie celular, las células no se lisan, y los niveles en la superficie celular de CCR2 se miden usando uno de los inmunoensayos descritos en el presente documento. Un inmunoensayo preferido para determinar los niveles en la superficie celular de CCR2 incluye las etapas de marcar las proteínas de la superficie celular con un marcador detectable, tal como biotina o ¹²⁵I, inmunoprecipitar CCR2 con un anticuerpo anti-CCR2 y a continuación detectar la CCR2 marcada.

20 **[0205]** Otro inmunoensayo para la determinación de la localización de CCR2, por ejemplo, los niveles en la superficie celular, es mediante el uso de inmunohistoquímica. Un inmunoensayo para detectar los niveles en la superficie celular de CCR2 incluye la unión de un anticuerpo anti-CCR2 marcado con un fluoróforo apropiado, tal como fluoresceína o ficoeritrina, y detectar el anticuerpo primario usando citometría de flujo. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 no está marcado y un segundo anticuerpo u otra molécula que se puede unir el anticuerpo anti-CCR2 está marcado. Los procedimientos tales como ELISA, RIA, citometría de flujo, transferencia de Western, inmunohistoquímica, marcaje de la superficie celular de proteínas integrales de membrana e inmunoprecipitación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, supra. Además, los inmunoensayos se pueden escalar para un cribado de alto rendimiento con el fin de probar un gran número de compuestos, ya sea para la activación o inhibición de CCR2.

30 **[0206]** Los anticuerpos anti-CCR2 también pueden ser utilizados para determinar los niveles de CCR2 en un tejido o en células derivadas del tejido. En algunos casos, el tejido es un tejido enfermo. En algunos casos, el tejido es una biopsia de tejido. En algunos casos del procedimiento, un tejido o una biopsia del mismo se extraen de un paciente. El tejido o la biopsia se utilizan después en un inmunoensayo para determinar, por ejemplo, la expresión de CCR2 total, los niveles en superficie celular de CCR2 o la localización de CCR2 mediante los procedimientos discutidos anteriormente. Tales procedimientos se pueden utilizar para determinar si un tejido expresa altos niveles de CCR2, que podría ser indicativo de que el tejido es una diana para el tratamiento con anticuerpo anti-CCR2.

35 **[0207]** Los anticuerpos también se pueden usar in vivo para identificar los tejidos y órganos que expresan CCR2. En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 se utilizan para identificar células que expresan CCR2.

40 **[0208]** El procedimiento comprende las etapas de administrar un anticuerpo anti-CCR2 marcado de forma detectable o una composición que lo comprende a un paciente en necesidad de dicha prueba diagnóstica y someter al paciente a análisis de imagen para determinar la localización de los tejidos que expresan CCR2. El análisis de imagen es bien conocido en la técnica médica, e incluye, sin limitación, análisis de rayos X, imágenes por resonancia magnética (MRI) o tomografía computarizada (CT). El anticuerpo puede marcarse con cualquier agente adecuado para formación de imágenes in vivo, por ejemplo un agente de contraste, tal como bario, que puede ser utilizado para el análisis de rayos X, o un agente de contraste magnético, tal como un quelato de gadolinio, que se puede utilizar para la RM o TC. Otros agentes de marcaje incluyen, sin limitación, radioisótopos, tales como ⁹⁹Tc. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 será no marcado y será observado mediante la administración de un segundo anticuerpo u otra molécula que es detectable y que se puede unir el anticuerpo anti-CCR2. En otro caso, se obtiene una biopsia del paciente para determinar si el tejido de interés expresa CCR2.

55 **[0209]** En algunos casos, el anti-CCR2 marcado de forma detectable comprende un fluoróforo. En ciertos casos, el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste de un colorante fluorescente de infrarrojo cercano, dinitrofenilo, fluoresceína y sus derivados, rodamina, derivados de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina, TEXAS RED™, RHODAMINE GREEN™, OREGON GREEN™, CASCADE BLUE™, ficoeritrina, CY3™, CY5™, CY2™, CY7™, coumarina, infrarrojo 40, MR 200, IRD 40, ALEXA FLUOR™, Tetrametilrodamina, PACIFIC BLUE™, SYBR™, y BODIPY™. En otro caso, el fluoróforo incluye uno de los siguientes compuestos con su máximo de emisión indicado en nm entre paréntesis, CY2™ (506), GFP (Red Shifted) (507), YO-PRO®-1 (509), YOYO®-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FLUORX® (519), ALEXA® (520), Rodamina 110 (520), 5-FAM (522), OREGON GREEN® 500 (522), OREGON GREEN® 488 (524), RIBOGREEN® (525), RHODAMINE GREEN® (527), Rodamina 123 (529), MAGNESIUM GREEN® (531), CALCIUM GREEN® (533), TO-PRO®-1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY®

530/550 (550), Dil (565), BODIPY® (568), BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564/570 (570), CY3® (570), ALEXA® 546 (570), TRITC (572), MAGNESIUM ORANGE® (575), ficoeritrina R&B (575), Rodamina Faloidina (575), CALCIUM ORANGE® (576), Pironina Y (580), Rodamina B (580), TAMRA (582), RHODAMINE RED® (590), CY3.5® (596), ROX (608), CALCIUM CRIMSON™ (615), ALEXA® 594 (615), TEXAS RED™ (615), Nile Red (628), YO-PRO®-3 (631), YOYO®-3 (631), R-ficocianina (642), C-Ficocianina (648), TO-PRO®-3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DiIC(5) (665), CY5™ (670), Tiadicarbocianina (671) y Cy5.5™ (694).

Procedimientos terapéuticos de uso

10 **[0210]** En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para inhibir la actividad de CCR2 mediante la administración de un anticuerpo anti-CCR2 a un paciente en necesidad del mismo. Cualquiera de los tipos de anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse terapéuticamente. En varios casos, el anticuerpo anti-CCR2 es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. En algunos casos, el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, se une al primer y/o
15 segundo bucle extracelular de CCR2. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, preferiblemente no se une al tercer bucle extracelular o al dominio N-terminal de CCR2.

[0211] Todavía en otro caso, el CCR2 es humano y el paciente es un paciente humano. Alternativamente, el paciente puede ser un mamífero que expresa un CCR2 con el que el anticuerpo anti-CCR2 reacciona de forma cruzada. El anticuerpo se puede administrar a un mamífero no humano que expresa CCR2 con el que el anticuerpo reacciona de
20 forma cruzada con fines veterinarios o como un modelo animal para enfermedad humana. Tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos.

[0212] En un aspecto, se proporcionan procedimientos para el tratamiento, ayuda en el tratamiento, prevención o ayuda en la prevención de un trastorno mediado por CCR2 en un sujeto mediante administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CCR2. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "un trastorno mediado por CCR2" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de altos niveles de expresión o actividad de CCR2 en un sujeto que padece el trastorno se ha demostrado que son, o son sospechosos de ser, responsables de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento de la enfermedad. Tales trastornos pueden ponerse de manifiesto, por ejemplo, por un aumento en los niveles de CCR2 en la superficie celular en las células o tejidos afectados de un sujeto que padece el trastorno, o por un incremento en una actividad mediada por CCR2 en un tipo de célula, tal como en basófilos, monocitos o linfocitos, que contribuye a la patología de la enfermedad o que contribuye al empeoramiento del trastorno o por un aumento en el nivel de ligandos de CCR2, tales como MCP-1, en un sitio inflamatorio. El aumento en la expresión de CCR2 se puede detectar, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-CCR2. Un aumento en la actividad de CCR2 puede ser detectado por un aumento en la activación de la proteína G, la polimerización de actina F o el aumento de la quimiotaxis de células que expresan CCR2, tales como la quimiotaxis en respuesta a MCP-1 u otros ligandos de CCR2.
35

[0213] En un aspecto, el trastorno mediado por CCR2 se caracteriza por fibrosis. El término "fibrosis" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un estado patológico caracterizado por deposición excesiva y metabolismo de material fibrótico (por ejemplo, matriz extracelular) en respuesta a daño tisular. En muchos casos, la fibrosis representa un proceso de reparación normal (es decir, cicatrización de heridas) que salió mal debido a una lesión tisular crónica o excesiva que conduce a la activación y proliferación de fibroblastos o células estrelladas y la acumulación de colágeno. Las condiciones de la fibrosis incluyen trastornos fibroproliferativos que están asociados con enfermedades vasculares, tales como enfermedad cardíaca, enfermedad cerebral, y enfermedad vascular periférica, así como todos los principales tejidos y sistemas de órganos, tales como el ojo, piel, riñón, pulmón, intestino y el hígado (Wynn, Nature Reviews 4: 583-594 (2004); Bataller, R y Brenner, D., J. Clin Invest. 115: 209-218 (2005)). Otras fuentes son fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por radiación y lesiones y quemaduras. Si bien las afecciones de la fibrosis cubren un amplio grupo de patologías, se cree que para la mayoría de estas afecciones, los mecanismos generales que conducen a la acumulación de tejido fibrótico tienen muchos elementos en común. A menudo, la afección se inicia en respuesta a una afluencia de células inflamatorias y se perpetúa por las posteriores vías de señalización de citoquinas entre las células infiltrantes (por ejemplo, los macrófagos, las células T) y células residentes en el tejido (por ejemplo, estrelladas, miofibroblastos o células de Kupffer). Por ejemplo, MCP-1 se ha demostrado que desempeña un papel en varias enfermedades del pulmón (Rose CE JR, Sung SS, Fu SM Microcirculation. 10: 273-288 (2003)) y ratones deficientes en CCR2 están protegidos del desarrollo de la fibrosis pulmonar (Moore BB, et al Protection from Pulmonary Fibrosis in the absence of CCR2 Signaling. J. Immunol. 167: 4368-4377 (2001)), lo que sugiere un papel clave de este receptor en el pulmón. Del mismo modo, los pericitos son un tipo de célula fibrogénica clave implicada en el desarrollo de la esclerodermia y se ha demostrado que los inhibidores de la tirosina quinasa del receptor de PDGF (RTK) retardan la proliferación de los pericitos y suprimen lesiones de la piel en pacientes con esta enfermedad progresiva. En el riñón, la infiltración de leucocitos juega un papel importante en la mediación de la inflamación tubulointersticial y de la fibrosis en la enfermedad renal crónica. Vielhauer et al. han demostrado que en un modelo de ratón de la nefropatía obstructiva, la expresión de CCR2 y CCR5 en la acumulación de
60

macrófagos y linfocitos CD3+ se correlaciona con la fibrosis progresiva en sitios de daño tisular (Vielhauer V, et al. J. Am. Soc. . Nephrol 12: 1173-1187 (2001)).

5 [0214] Como se usa en el presente documento el término "fibrosis" se utiliza también como sinónimo de "acumulación de fibroblastos y deposición de colágeno". Los fibroblastos son células del tejido conectivo que se dispersan en el tejido conectivo de todo el cuerpo. Los fibroblastos secretan una matriz extracelular no rígida que contiene colágeno de tipo I y/o colágeno de tipo III. En respuesta a una lesión de un tejido, los fibroblastos cercanos o células estrelladas migran en la herida, proliferan y producen grandes cantidades de matriz extracelular colagenosa. El colágeno es una proteína fibrosa rica en glicina y prolina que es un componente principal de la matriz extracelular y el tejido conectivo, cartílago, y hueso. Las moléculas de colágeno son estructuras helicoidales de cadena triple llamadas cadenas alfa, que se enrollan alrededor de la otra en una hélice como una cuerda. El colágeno existe en varias formas o tipos; de estos, el tipo I, el más común, se encuentra en la piel, tendón y hueso; y el tipo III se encuentra en la piel, vasos sanguíneos y órganos internos. Las afecciones de la fibrosis de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, enfermedades pulmonares asociadas con la fibrosis, por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis inducida por la radiación, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esclerodermia, bleomicina inducida por la fibrosis pulmonar, asma crónica, silicosis, fibrosis pulmonar inducida por amianto, lesión pulmonar aguda y dificultad respiratoria aguda (incluyendo inducida por neumonía bacteriana, inducida por trauma, inducida por neumonía viral, inducida por ventilación, inducida por sepsis no pulmonar e inducida por aspiración inducida); nefropatías crónicas asociadas con la lesión/fibrosis (fibrosis renal), por ejemplo, lupus, diabetes, escleroderma, nefritis glomerular, esclerosis glomerular focal segmental, nefropatía por IgA, hipertensión, aloinjerto, Lupus, y Alport; fibrosis de los intestinos, por ejemplo, esclerodermia, y fibrosis intestinal inducida por radiación; fibrosis hepática, por ejemplo, cirrosis, fibrosis hepática inducida por alcohol, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), lesión de los conductos biliares, cirrosis biliar primaria, infección o la fibrosis hepática inducida por virus (por ejemplo, infección crónica por HCV), y hepatitis autoinmune; fibrosis de cabeza y cuello, por ejemplo, inducida por radiación; cicatrización de la córnea, por ejemplo, LASIX®, trasplante de córnea, y la trabeculectomía; cicatrices hipertróficas y queloides, por ejemplo, quemadura inducida y quirúrgica; y otras enfermedades fibróticas, por ejemplo, sarcoidosis, esclerodermia, lesión de la médula espinal/fibrosis, mielofibrosis, restenosis vascular, aterosclerosis, granulomatosis de Wegener, enfermedad mixta del tejido conectivo, y la enfermedad de Peyronie.

30 [0215] En un aspecto, el trastorno mediado por CCR2 se caracteriza por inflamación patológica. El término "inflamación patológica" como se usa en el presente documento se refiere a una inflamación inapropiada y/o crónica asociada con trastornos incluyendo, pero no limitado a, asma, aterosclerosis, demencia por SIDA, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple (especialmente para inhibir aún más la desmielinización), tumores, metástasis tumoral, nefritis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia miocárdica y prostatitis crónica, obesidad, síndrome metabólico. Dicha inflamación se caracteriza por una mayor respuesta de células inflamatorias, incluyendo leucocitos infiltrantes. Con el tiempo, dicha inflamación patológica a menudo resulta en daño a los tejidos en la región de la inflamación inapropiada. Por consiguiente, se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto que tiene inflamación patológica que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que se une a e inhibe CCR2.

40 [0216] El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, también se pueden usar para tratar trastornos en los que está implicada la activación del CCR2 mediante la unión de quimioquinas, incluyendo MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4.

45 [0217] Los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) se pueden utilizar para tratar enfermedades y afecciones inflamatorias o alérgicas, incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias, tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades intersticiales pulmonares (ILD) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, o ILD asociada con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis), enfermedad pulmonar obstructiva crónica, anafilaxis o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos (por ejemplo, a la penicilina, cefalosporinas), alergias a picaduras de insectos, enfermedades inflamatorias del intestino, tales como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, espondiloartropatías, escleroderma, psoriasis y dermatosis inflamatorias, tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, urticaria, vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea, y por hipersensibilidad).

55 [0218] Los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) se pueden utilizar para tratar enfermedades autoinmunes. Ejemplos de trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Addison, anemia hemolítica, síndrome anti-fosfolípido, artritis reumatoide, dermatitis, encefalomielitis alérgica, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple, miastenia gravis, neuritis, oftalmia, pénfigoide bulloso, pénfigo, poliendocrinopatías, púrpura, enfermedad de Reiter, Síndrome de Stiff-Man, tiroiditis autoinmune, lupus eritematoso

sistémico, inflamación pulmonar autoinmune, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus insulino dependiente y enfermedad ocular inflamatoria autoinmune.

5 **[0219]** En ciertos casos, la enfermedad autoinmune tratada con los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas es la artritis reumatoide (RA). Un trastorno TH1, RA es una enfermedad autoinmune humana común con una prevalencia de alrededor del 1% entre los caucásicos (Harris, BJ et al., 1997, en Textbook of Rheumatology 898-932), que afecta actualmente a 2,5 millones de estadounidenses. La RA se caracteriza por inflamación crónica de las articulaciones sinoviales e infiltración por células T activadas, macrófagos y células plasmáticas, lo que lleva a una destrucción progresiva del cartilago articular. Es la forma más grave de la enfermedad de las articulaciones.

10 **[0220]** En todavía otro aspecto, la enfermedad autoinmune tratada con los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas es la esclerosis múltiple (MS). La MS, también un trastorno TH1, es la enfermedad desmielinizante más común del sistema nervioso central (SNC), que afecta a 350.000 (0,1%) personas en Norteamérica y 1,1 millones en todo el mundo. En general, MS se considera que es una enfermedad autoinmune mediada en parte por las células proinflamatorias CD4 T (Th1) y los monocitos que reconocen polipéptidos de mielina específicos en asociación con moléculas MHC de clase II expresadas en células presentadoras de antígeno (Ag) (APC).

15 **[0221]** Los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 4.0 y/o 4.9 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) se pueden utilizar para tratar la diabetes mellitus de tipo I humano o dependiente de insulina (IDDM), una enfermedad caracterizada por la destrucción autoinmune de las células beta en los islotes pancreáticos de Langerhans. El agotamiento de las células beta da lugar a una incapacidad para regular los niveles de glucosa en la sangre. En los seres humanos un período presintomático largo precede a la aparición de la diabetes. Durante este período se produce una pérdida gradual de la función de las células beta del páncreas. El desarrollo de la enfermedad está implicada por la presencia de autoanticuerpos contra la insulina, ácido glutámico descarboxilasa, y la tirosina fosfatasa IA2 (IA2).

20 **[0222]** Los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) también se puede utilizar para tratar el dolor neuropático. Los ratones que carecen del CCR2 se ha demostrado que han reducido el dolor neuropático (Abbadie et al, Proc Natl Acad Sci USA. 100 (13): 7947-52 (2003)). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dolor neuropático" significa el dolor resultante de lesión de un nervio. El dolor neuropático se distingue de dolor nociceptivo, que es el dolor causado por la lesión tisular aguda que implica pequeños nervios cutáneos o pequeños nervios en los músculos o el tejido conjuntivo. El dolor que implica un mecanismo nociceptivo generalmente está limitado en duración al periodo de reparación del tejido y en general se alivia por agentes analgésicos disponibles u opioides tal como se describe en Myers, Regional Anesthesia 20: 173-184 (1995). El dolor neuropático típicamente es de larga duración o crónico y, a menudo desarrolla durante días o meses después de una lesión tisular aguda inicial. El dolor neuropático puede implicar dolor persistente, espontáneo, así como alodinia, que es una respuesta dolorosa a un estímulo que normalmente no es doloroso. El dolor neuropático también se puede caracterizar por la hiperalgesia, en el que hay una respuesta acentuada a un estímulo doloroso que por lo general es trivial, tal como un pinchazo de alfiler.

30 **[0223]** Los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas son útiles en el alivio de dolor neuropático resultante de un trastorno de los nervios periféricos, ganglios de raíz dorsal, médula espinal, tronco cerebral, tálamo o corteza. El procedimiento es útil para aliviar el dolor neuropático, independientemente de la etiología del dolor. Por ejemplo, un procedimiento puede ser utilizado para aliviar el dolor neuropático resultante de un trastorno nervioso periférico, tal como neuroma; la compresión del nervio; aplastamiento del nervio, estiramiento del nervio o transección incompleta del nervio; mononeuropatía o polineuropatía. También se puede utilizar un procedimiento para aliviar el dolor neuropático resultante de un trastorno como la compresión de ganglio de la raíz dorsal; inflamación de la médula espinal; contusión, tumor o hemisección de la médula espinal; tumores del tronco cerebral, tálamo o corteza; o traumatismo en el tronco cerebral, tálamo o corteza

40 **[0224]** Los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos funcionales de los mismos) pueden también utilizarse para tratar la aterosclerosis. La placa aterosclerótica se desarrolla durante varias décadas e implica la infiltración de células inflamatorias, proliferación de células del músculo liso, la acumulación de matriz extracelular, la formación de capa fibrosa, y la angiogénesis. (Bayes-Genis et al Circ Res 86: 125-130 (2000)). La quimiotaxis está implicada en el desarrollo temprano de la aterosclerosis. Las poblaciones de células migran hacia la parte interior de la pared vascular y se origina la neointima, que conduce a la formación de una placa aterosclerótica. Por ejemplo, la quimiotaxis de monocitos se induce por la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), que se expresa temprano en el desarrollo de la aterosclerosis en la pared arterial lesionada. (Furukawa et al Circ Res 84: 306-314 (1999); Han et al J. Lipid Res. 40: 1053 (1999)). El trasplante de médula ósea de ratones CCR2 ^{-/-}, pero no de ratones CCR2 ^{+/+}, en ratones ApoE3-Leiden, una cepa de ratón susceptible a la aterosclerosis inducida por la dieta, disminuye la aterogénesis, lo que sugiere que la señalización de MCP-1 a través de CCR2 contribuye a la aterosclerosis (Guo et al (2003) Arterioscler Thromb Vasc Biol; 23 (3): 447-53). Por consiguiente, los

anticuerpos antagonistas de CCR2 y, en particular, los anticuerpos antagonistas que se unen al primer y/o segundo bucle extracelular de CCR2, se pueden administrar a un sujeto para reducir la incidencia de, para tratar, o para ayudar en el tratamiento de la aterosclerosis.

5 **[0225]** Los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) también se pueden utilizar para tratar la obesidad. En la obesidad, el tejido adiposo se ha demostrado que contiene un gran número de monocitos. Estos monocitos pueden contribuir a la deposición de grasa o al desarrollo de diversas secuelas comúnmente asociados con la obesidad comúnmente denominados síndrome metabólico. El síndrome metabólico incluye alteraciones tales como el desarrollo de la diabetes.

10 **[0226]** Los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) también se pueden utilizar para tratar la estenosis o reestenosis de la vasculatura, particularmente de las arterias, por ejemplo, la arteria coronaria, tal como estenosis o reestenosis que resulta de intervención vascular (por ejemplo, intervención quirúrgica, terapéutica o mecánica), así como la hiperplasia neointima. Por ejemplo, la reestenosis, que normalmente produce un estrechamiento de la abertura luminal del vaso, puede resultar de una lesión vascular incluyendo, pero no limitado a, la producida por procedimientos de injerto vascular, angioplastia, incluyendo angioplastia realizada por balón, aterectomía, láser u otro procedimiento adecuado (por ejemplo, angioplastia coronaria transluminal (PTCA)), colocación de stent (por ejemplo, colocación mecánica o biológica de un stent endovascular), procedimientos de derivación vascular o combinaciones de los mismos, así como otros procedimientos usados para tratar vasos sanguíneos ocluidos o estenóticos.

15 **[0227]** Los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) también se pueden utilizar para tratar el rechazo de injerto (por ejemplo, en trasplante), incluyendo rechazo de aloinjertos o enfermedad de injerto contra huésped, y arteriosclerosis asociada al trasplante de órganos.

20 **[0228]** Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son antagonistas de CCR2 pueden usarse como agentes terapéuticos para la infección por VIH. VIH-1 y VIH-2 son los agentes etiológicos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en seres humanos. El SIDA resulta en parte del agotamiento de linfocitos T CD4+ en individuos infectados con VIH. El VIH-1 infecta principalmente linfocitos T, monocitos/macrófagos, células dendríticas y, en el sistema nervioso central, microglia. Todas estas células expresan la glicoproteína CD4, que sirve como un receptor para el VIH-1 y VIH-2. La entrada eficiente del VIH en las células diana depende de la unión de la glicoproteína de la envuelta exterior viral, gp120, al dominio CD4 amino-terminal.

25 **[0229]** Además, se ha demostrado que el CCR2 actúa como un coreceptor para el VIH-1 (Frade et al (1997) J Clin Invest; 100 (3): 497-502). Después de la unión del virus, las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1 median en la fusión de las membranas virales y de la célula huésped para completar el proceso de entrada. La fusión de membrana dirigida por las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1 expresadas en la superficie celular infectada conduce a la fusión célula-célula, dando como resultado sincitios.

30 **[0230]** Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son antagonistas de CCR2 pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de una variedad de afecciones de oftalmología, incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), uveítis e infecciones corneales.

35 Degeneración Macular Relacionada con la Edad (DMAE)

40 **[0231]** Se ha demostrado que el CCR2 desempeña papel en el reclutamiento de macrófagos en el desarrollo de la neovascularización coroidal (CNV) que se observa en pacientes con degeneración macular relacionada con la edad, así como en estrías angioideas, miopía alta, pacientes con histoplasmosis ocular (Tsutsumi, C. et al Journal of Leukocyte Biology 74: 25-32, 2003).

Uveítis

45 **[0232]** Se ha demostrado una asociación entre polimorfismos de nucleótido único de CCR2 y su ligando (MCP-1) en pacientes con uveítis anterior idiopática aguda (Yeo, TK, et al Cytokine 35: 29-35 2006) y uveítis del segmento posterior idiopática mediada por el sistema inmunitario (Ahad, MA, et al. Mol Vis 13: 388-396 2007)

Infecciones de la córnea (bacterianas):

50 **[0233]** Se ha demostrado que CCL2 desempeña un papel en la regulación del reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) durante la infección corneal (Xue, M. L, et al Immunology and Cell Biology. 85: 525-531

2007). Aunque los PMN son esenciales para la eliminación de bacterias y la promoción de la cicatrización de heridas en la córnea, la persistencia de estas células puede dar lugar a una enfermedad inflamatoria crónica.

5 **[0234]** Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son antagonistas de CCR2 pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de una variedad de tumores y cánceres sólidos, incluyendo leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, mieloma maligno, enfermedad de Hodgkin, y carcinomas de próstata, vejiga, mama, cuello del útero, colon, pulmón, hígado o tumores y cánceres sólidos de estómago.

10 Cáncer de próstata

15 **[0235]** Se ha demostrado que MCP-1 actúa como un factor paracrino y autocrino para el crecimiento y la invasión del cáncer de próstata (Lu, Y. et al *The Prostate* 66: 1311-1318, 2006) y se ha demostrado que la expresión de CCR2 se correlaciona con la progresión del cáncer de próstata (Lu, Y. et al *Journal of cellular biochemistry* 101: 676-685, 2007). La liberación sistémica de anticuerpos anti-MCP-1 neutralizantes se ha demostrado que induce la regresión del tumor de cáncer de próstata en ratones (Loberg, RD, *Cancer Res* 67: 9417-9424 2007).

Cáncer de mama

20 **[0236]** Se cree que los macrófagos asociados a tumores desempeñan un papel crítico en la vigilancia inmune y el desarrollo del tumor y la activación y el reclutamiento de linfocitos están regulados por quimioquinas, incluyendo MCP-1. Se ha demostrado una asociación significativa para polimorfismo de CCR2 en cáncer de mama (Zafiroopoulos, A., N. et al *Journal of medical genetics*. 41: e59 2009). También se ha demostrado que la vía de CCL2/CCR2 desempeña un papel fundamental en el reclutamiento del cáncer, incluyendo cáncer de mama, de ovario y cánceres gástricos, de células supresoras mieloides, que promueven la progresión tumoral, la angiogénesis y la vasculoangiogenesis (Huang, B., et al. *Cancer Letters* 252: 86-92, 2007).

Melanoma

30 **[0237]** También se ha demostrado que el bloqueo de la función de MCP-1 inhibe el reclutamiento de macrófagos asociados al tumor y previenen la angiogénesis tumoral y el crecimiento en melanoma maligno en ratones (Koga, M. et al *Biochemical and Biophysical research communications* 365: 279-284 , 2008).

Cáncer de hígado

35 **[0238]** Se ha demostrado que el bloqueo de CCR2 reduce el tráfico de las células estrelladas hepáticas, una fuente principal de la matriz metaloproteínasa 2, lo que facilita la neovascularización durante la formación del tumor en el hígado (Yang, X. et al *International Journal of Cancer*. 118: 335-345, 2006).

Cáncer de cuello uterino

40 **[0239]** Se ha demostrado que el CCR2 desempeña un papel en el reclutamiento de macrófagos que conduce a la angiogénesis tumoral en el desarrollo de neoplasia cervical de lesiones intraepiteliales escamosas (Coelho, A., et al *Gynecologic Oncology* 96: 760-764, 2005; Coelho, . A., et al *Gynecologic and Obstetric investigation* 64: 208-212, 2007).

45 Cáncer de ovarios

50 **[0240]** También se ha demostrado que la vía de CCL2/CCR2 desempeña un papel fundamental en el reclutamiento de cáncer, incluyendo cáncer de mama, de ovario y cánceres gástricos, de células supresoras mieloides, que promueven la progresión tumoral, la angiogénesis y la vasculoangiogenesis (Huang, B., et al *Cancer*. 252: 86-92, 2007).

55 **[0241]** El anticuerpo puede administrarse una vez o múltiples veces. El anticuerpo puede administrarse a partir de cuatro veces al día a una vez cada seis meses o más. La administración puede estar en un programa de tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. El anticuerpo también se puede administrar de forma continua a través de una minibomba. El anticuerpo se puede administrar a través de una ruta de mucosa, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral o tópica. El anticuerpo se puede administrar localmente o sistémicamente.

60 **[0242]** El anticuerpo se puede administrar una vez, al menos dos veces o durante al menos el período de tiempo hasta que la afección es tratada, paliada o curada. El anticuerpo se administrará generalmente como parte de una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento. La dosificación del anticuerpo estará generalmente en el

intervalo de 0,1-100 mg/kg, 0,5-50 mg/kg, 1-20 mg/kg, o 110 mg/kg. La concentración sérica del anticuerpo se puede medir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica.

[0243] Los siguientes ejemplos son sólo para ilustración y no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance.

EJEMPLO 1

Generación de hibridomas productores de anticuerpo anti-CCR2

[0244] Se inmunizaron ratones XENOMOUSE® de ocho a diez semanas de vida que producen anticuerpos IgG2 e IgG4 humanos en sus almohadillas plantares traseras con células 300-19 transfectadas con CCR2B (Genbank MN000648, SEQ ID NO: 204) (10^7 células/dosis/ratón en TITERMAX® Gold Adjuvant, Sigma, nº de catálogo T2684, lote # K1599; preparar 50/50 volumen). Los ratones recibieron de cinco a nueve inyecciones de refuerzo en fosfato de adyuvante en gel de fosfato de aluminio (Catálogo # 1452-250, lote # 8937, HCl Biosector (5 ul/ratón/refuerzo)) y qCpG (adyuvante de ratón IMMUNEASY®) (Catálogo # 303101; lote # 11551249; Qiagen (15ul/ratón/refuerzo)) durante un período de tres a ocho semanas. Cuatro días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección final en PBS. Se recogieron los linfocitos de bazo y ganglios linfáticos de ratones inmunizados y se fusionaron con la línea celular P3-X63-Ag8.653 de mieloma no secretor. Las células fusionadas fueron sometidos a selección HAT, tal como se describió previamente (Galfre y Milstein, Methods Enzymol. 73: 3-46 (1981)). Se recuperó un panel de hibridomas que secretaban los anticuerpos humanos específicos de CCR2. Se identificó un número de anticuerpos por la unión a CCR2, tal como se evaluó mediante análisis de FACS. Se seleccionaron hibridomas para un estudio adicional, algunos de los cuales se enumeran en la Tabla 6.

[0245] Los hibridomas que se indican en la Tabla 2 fueron depositados bajo los términos de acuerdo con el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209. A los hibridomas se han asignado los siguientes números de acceso:

Tabla 2

Anticuerpo	Designación de la línea celular de hibridoma de ratón	Designación de la cepa	Designación ATCC	Fecha de depósito
4.9.3	PF11-4.9.3	LN 15923	PTA-6979	16 de septiembre de 2005
4.22.3	PF11-4.22.3	LN 15924	PTA-6980	16 de septiembre de 2005
4.40.3	PF11-4.40.3	LN 15925	PTA-6981	16 de septiembre de 2005
7.123.1	PF11-7.123.1	LN 15931	PTA-7341	31 de enero de 2006
8.19.1.1	PF11-8.19.1.1	LN 15932	PTA-7342	31 de enero de 2006

EJEMPLO 2

Secuenciación de anticuerpos anti-CCR2

[0246] Para analizar la estructura de los anticuerpos producidos, fueron clonados ácidos nucleicos que codificaban el dominio variable de cadena pesada y ligera que contiene fragmentos de los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales anti-CCR2. Las cadenas ligeras y las cadenas ligeras de los anticuerpos CCR2 se clonaron y se verificó la secuencia como se ejemplifica para el anticuerpo 4.40.2 de la siguiente manera:

Se aisló poli (A)⁺ ARNm utilizando un minikit RNeasy® (Qiagen) y se sintetizó ADNc a partir del ARNm con el kit ADVANTAGE RT-for-PCR(BD Biosciences) usando cebadores de oligo (dT). El ADNc cebado con oligo (dT) se amplificó para el clon 4.40.2 usando los cebadores enumerados en la Tabla 3. La amplificación se consiguió utilizando la polimerasa PFUULTRA HIGH FIDELITY (Stratagene) y un PTC-200 DNA Engine (MJ Research) con ciclado de la siguiente manera: a 95°C; 25X (20" a 95°C, 30" a 55°C , 30" a 72°C); 10' a 72°C. Los amplicones de PCR se clonaron en los vectores de expresión de cadena pesada y ligera. Los vectores se transformaron a continuación en células químicamente competentes MAX EFFICIENCY DH5α (Invitrogen) utilizando el protocolo estándar. Los clones se verificaron por la secuencia usando química Grills 16^a BDTv3.1/dGTP (Applied Biosystems Inc) y un analizador de ADN 3730xl (Applied Biosystems Inc). A partir de la secuencia de nucleótidos y la secuencia predicha de aminoácidos de los anticuerpos, el uso del gen se identificó para cada cadena de anticuerpo. Se realizaron alineaciones con respecto a "V Base sequence directory" (MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido; Tomlinson, et al, J. Mol Biol, 227, 776-798 (1992); Hum Mol Genet, 3, 853-

860 (1994); EMBO J., 14, 4.628-4.638 (1995)) utilizando los programas informáticos MACVECTOR® y GENEWORKS® (Oxford Molecular Group, Campbell, CA, USA)

Tabla 3: Cebadores de dominio variable diseñados para amplificar 4.40.2 (5' a 3')

CCR2_440_VH_62_F	VH3.30	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (SEQ ID NO: 147)
CCR2_440_VH_G2_R	JH3b	GAAGAGACGGTGACCATTGTCCCTT (SEQ ID NO: 148)
CCR2_440_VL_K_F	A26	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGAC (SEQ ID NO: 149)
CCR2_440_VL_K_R	JK4	GTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTC (SEQ ID NO: 150)

[0247] La Tabla 4 expone la utilización de los genes de clones de anticuerpos de hibridoma seleccionados.

Tabla 4

Utilización de genes de cadena pesada y cadena ligera					
Clon	Línea germinal de cadena pesada			Línea germinal de cadena ligera kappa	
	V _H	D _H	J _H	V _K	J _K
4.9.3	VH3-30	D1-7	JH3B	O12	JK2
4.22.3	VH1-46	D1-7	JH3B	A1	JK5
4.39.3	VH1-46	D1-7	JH3B	B3	JK1
4.40.3	VH3-30	D1-7	JH3B	A26	JK4

[0248] Los clones de hibridoma se generaron en ratones IgG4 y una vez se obtuvieron las secuencias, los dominios variables se clonaron en vectores de expresión de formato IgG1, IgG2 e IgG4 para la comparación.

EJEMPLO 3

Mutagénesis de anticuerpos anti-CCR2

Reversión a la secuencia de línea germinal en la región variable de cadena ligera

[0249] El residuo alanina en la posición 68 en la cadena ligera de CCR2 4.40.2 se revirtió al residuo de la línea germinal, glicina, mediante mutagénesis dirigida al sitio de la siguiente manera. La mutación puntual en el codón para el residuo de aminoácido 68 se cambió utilizando los cebadores en la Tabla 5. La mutagénesis dirigida se realizó usando un kit de mutagénesis dirigida de sitio QUICKCHANGE® II (Stratagene) con el protocolo estándar, incluyendo las siguientes modificaciones al ciclo: 2' a 96°C; 16X (50" a 96°C, 10" a 68°C); 10" a 68°C. El vector mutagenizado se transformó en células supercompetentes XL1-Blue. Para verificar que la mutagénesis fue exitosa, los clones se secuenciaron usando química Grills 16^a BDTv3.1/dGTP (Applied Biosystems Inc.) y un analizador de ADN 3730xl (Applied Biosystems Inc.)

Tabla 5: Cebadores de mutagénesis (5' a 3')

CCR2_440_VK_G68A_F	GGCAGTGGATCTGG G GACAGATTTACC (SEQ ID NO: 151)
CCR2_440_VK_G68A_R	GGTGAATCTGT C CCAGATCCACTGCC (SEQ ID NO: 152)

* nucleótido cambiado está en negrita y subrayado.

[0250] El anticuerpo resultante se denominó 4.40 A68G (SEQ ID NO: 112), que tenía una glicina en la posición 68 de la región variable de cadena ligera.

Generación de la región constante de cadena pesada IgG4 con la mutación que estabiliza la bisagra

[0251] Las regiones constantes de cadena pesada de IgG4 fueron aisladas de un vector de expresión de IgG4 derivado de pCon-G4 (pro) (Lonza, Basilea, Suiza) que tiene una mutación que estabiliza la región de bisagra de la línea germinal, serina a prolina en el aminoácido 230 (Angal, S. et al Molecular Immunology 30: 105-108 (1993)), en el contexto del alotipo de IgG4 L309 (Brusco A. et al, Eur J. Immunogenetics. 25: 349-355 (1998)).

[0252] Se introdujo una mutación silenciosa (Lys, AAG -> AAA) por mutagénesis de PCR en el residuo de nucleótidos 11 del exón G4 CH1 de pCon-G4 vector (pro), para eliminar un sitio de reconocimiento Apal para facilitar la subclonación, utilizando los siguientes cebadores de amplificación:

Directo G4

ttatgctgggcccagctctgtcccacaccgcggtcacatggcaccacctctcttgcaGCTTCCACCA
AAGGCCCATCCGTCTTCCCCC (SEQ ID NO: 153)

5

(las bases de hibridación en mayúsculas (mutación de residuo # 11 de CH1 está en negrita); bases no hibridantes en minúsculas)

G4 inverso:

10

tcatattctctagaTCATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID No: 154)

(bases de hibridación en mayúsculas. Las bases no hibridantes con el sitio XbaI en minúsculas)

15 **[0253]** La amplificación se consiguió usando Expand Hi-Fi polimerasa (Roche) y un PTC-200 DNA ENGINE® (MJ Research) con ciclos térmicos de la siguiente manera: 3' a 95°C; 22X (20" a 95°C, 30" a 58°C, 2'10" a 72°C); 10' a 72°C.

[0254] Otra mutación silenciosa (Thr, ACC -> ACA) se introdujo mediante mutagénesis por PCR en el residuo de nucleótido 209 del exón G4 CH1 del vector pCon-G4 (pro) para eliminar un sitio BstEII a fin de facilitar el uso de esa enzima para la subclonación de regiones variables en el vector de expresión utilizando los siguientes cebadores: G4delBst_F
 CAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCAG (SEQ ID NO: 155)
 G4delBst_R
 CTGCTGGAGGGCACTGTCACCACGCTG (SEQ ID NO: 156).

25

[0255] La amplificación se consiguió usando el kit de mutagénesis dirigida de sitio QUIKCHANGE® (Stratagene) y un PTC-200 DNA ENGINE® (MJ Research) con ciclos térmicos de la siguiente manera: 1' a 96°C; 14X (50" a 96°C, 15'48" a 68°C); 10' a 72°C.

30 **[0256]** La región constante de IgG4 resultante que comprende la mutación de la región bisagra y los dos mutaciones silenciosas, referido como S230P, se subclonó a continuación como un fragmento Apal/XbaI en los sitios Apal/XbaI de un vector de expresión de anticuerpo DHFR. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo 4.40.2 se clonó a continuación en el vector de expresión que comprende la región constante G4 S230P que resulta en una construcción de cadena pesada de longitud completa. El anticuerpo derivado de 4.40 que tiene la sustitución en la línea germinal A68G en la región variable de cadena ligera y la sustitución S230P en la región bisagra de la cadena pesada fue designado como 4.40 A68G S230P que tiene la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 112 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 116.

35

40 **[0257]** Se recogieron los sobrenadantes de células transfectadas con los vectores de expresión y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A estándar para aislar inmunoglobulinas recombinantes. Estas proteínas se caracterizaron mediante SDS-PAGE, dispersión de luz, y espectrofotometría.

EJEMPLO 4

45 Unión in vitro

[0258] La figura 1 muestra la unión in vitro de anticuerpo 4.40 A68G S230P conjugado a AF-488 a monocitos humanos en sangre entera (Figura 1A), a las células 300-19 transfectadas con CCR2 (Figura 1B), y la unión de diferentes concentraciones de anticuerpo 4.40 A68G S230P a células 300-19 transfectadas con CCR2, tal como se detecta con PE anti-humano (Figura 1C). Brevemente, 1 millón de células en un volumen de 100 ul se tiñeron con el anticuerpo de prueba usando solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, que contiene 2% de suero bovino fetal inactivado por calor y 0,002% de azida de sodio. Quince minutos más tarde, se añadió un anticuerpo de detección secundario. Después de 30 minutos, las células se lavaron en tampón, se resuspendieron en 500 ul y se evaluaron para la tinción en un FACS Calibur. Se evaluaron un total de 10.000 eventos por tubo. La intensidad de fluorescencia promedio de canal se evaluó para cada concentración de anticuerpo como un indicador de la magnitud de la tinción.

55

EJEMPLO 5

Determinación de constantes de afinidad (K_D) de anticuerpos monoclonales anti-CCR2

5 [0259] Para evaluar la K_D de los anticuerpos para el CCR2, se evaluó la unión de anticuerpos a células 300-19 que expresan CCR2 mediante FACS en un ensayo de 3 horas. Brevemente, usando un tampón de salina tamponada con fosfato de Dulbecco que contiene 2% de suero fetal bovino inactivado por calor, 0,002% de azida de sodio y 0,005 mg/ml citocalasina-B (Sigma 6762), se tiñeron 1 millón de células en un volumen de 100 ul con el anticuerpo de prueba. Quince minutos más tarde, se añadió un anticuerpo de detección secundario fragmento F(ab') purificado por afinidad de burro anti-IgG humana H+L conjugado con R-ficoeritrina (Jackson 709-116-149). Los tubos se agitaron suavemente durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de 2 lavados en tampón, las células se resuspendieron en 500 ul de tampón y se evaluaron en un FACS CALIBUR®. Se evaluaron un total de 10.000 eventos por tubo. La intensidad de fluorescencia media de canal se evaluó para cada concentración de anticuerpo como un indicador para la magnitud de la tinción. Estos estudios de unión demostraron que el anticuerpo 4.40 A68G S230P se une a CCR2 humano en las células transfectadas con una K_D de 0,085 ug/ml (0,58 nM) (figura 2). Cuando la saturación de la unión se evaluó en células que expresan un receptor quimera CCR2/CCR5 que tiene el primer y segundo bucles extracelulares del CCR2 (véase el Ejemplo 7), se obtuvieron una curva de concentración y K_D similares (K_D = 0,023 ug/ml (0,16 nM)), tal como se muestra en la Figura 6C.

15 EJEMPLO 6

Inhibición de la quimiotaxis inducida por MCP-1

20 [0260] Se evaluaron anticuerpos anti-CCR2 humano por su capacidad para inhibir la quimiotaxis de monocitos THP-1 (ATCC # TIB 202), en respuesta al ligando de CCR2, MCP-1 (CCL2). La quimiotaxis se realizó en cámaras de quimiotaxis de 96 pocillos adquiridas de NeuroProbe, Inc. (Gaithersburg, MD), tal como se describe anteriormente (véase Gladue RP et al, J Biol Chem 278: 40.473-40.480 (2003)). Brevemente, CCL2 se diluyó en RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) que contenía 0,1% de BSA, y después se añadió a los pocillos inferiores de la cámara. Un filtro con poros de 5 μ m (Neuroprobe) se colocó entre los pocillos superior e inferior de la cámara. A continuación, se añadieron células THP-1 a la cámara superior (8×10^5) en presencia o ausencia de diversas concentraciones de los anticuerpos de ensayo. El aparato se incubó durante 3 horas en una incubadora humidificada al 5% de CO_2 a 37°C. Después del período de incubación, las células no migradas se extraen de la cámara superior y se limpió la parte superior del filtro. Se añadió 2 mM de EDTA frío a continuación a los pocillos superiores, y la cámara de quimiotaxis se incubó a 4°C durante 20 minutos. A continuación, el EDTA se eliminó y la placa de microtitulación de 96 pocillos se centrifugó a 800 xg durante 10 minutos. Se extrajo a continuación el filtro, el medio de cultivo se descartó, y se añadió 0,2% de FDA a las placas. Las placas se incubaron a continuación durante 1,5 horas a 37°C hasta que reveló un color amarillo. El número de células que migran se cuantificó mediante la lectura de la intensidad del color en un lector de placas de microtitulación a 490 nm. Como se muestra en la Tabla 6, se identificaron varios anticuerpos que inhibieron la quimiotaxis de THP1 en diferentes grados.

35 Tabla 6: Inhibición de la quimiotaxis de THP-1 inducida por MCP-1

Clon de anticuerpo	IC50 (ug/ml)
4.40.3	0,137
4.22.3	0,138
4.39.3	0,139
4.9.2	0,198
4.6.3	0,400
4.48.3	0,491
4.41.1	0,521
4.3.1	0,618
4.52.1	0,641
4.59.2	1,020
4.24.3	2,264

40 [0261] De manera similar, el anticuerpo 4.40 A68G S230P inhibió la quimiotaxis de monocitos THP-1 en respuesta a MCP-1 (IC50 = 0,148 ug/ml), pero no el ligando de CCR1/CCR5 MIP-1, tal como se muestra en la Figura 3.

Quimiotaxis de monocitos primarios

45 [0262] Se dispuso en capas sangre entera humana heparinizado sobre tubos ACCUSPIN HISTOPAQUE 1077 (Sigma; St. Louis, MO) y se centrifugaron. Se recogió la fracción de células mononucleares y se lavó 3 veces con PBS, los glóbulos rojos (RBC) se lisaron con agua, y se resuspendieron las células a 4×10^6 /ml en RPMI (Gibco; Grand Isle, NY) con 0,1% BSA (Sigma) y HEPES 10 mM (Gibco). Se añadieron diluciones de anticuerpos o de control de KLH a 0,25 nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ) y se colocaron 30 ul en la parte inferior de una cámara de Boyden de 48 pocillos (Neuroprobe;

Gaithersburg, MD); el control negativo fue el medio solo. Se colocó un filtro libre de PVP de 5 μ m (Neuroprobe) sobre ésta y la cámara se selló. Las células mononucleares aisladas se incubaron con diluciones de anticuerpos o de control de KLH durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 μ l a los pocillos superiores. La cámara se incubó durante 90 minutos a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se aspiraron de los pocillos superiores, la parte superior del filtro se secó, se secó al aire, se tiñeron con DIFF-QUICK® (Dade-Behring; Newark, DE), y se contó el número de células que migran en 6 campos. La inhibición de la quimiotaxis de los monocitos humanos aislados primarios en respuesta a MCP-1 por el anticuerpo 4.40 A68G S230P se muestra en la figura 4.

10 **[0263]** Además, como se ejemplifica con el anticuerpo 4.40, no se observó inhibición de las células THP-1 al ligando de CCR1/CCR5 MIP-1a (Figura 3).

EJEMPLO 7

15 Construcción de la Quimera CCR2/CCR1

[0264] Los anticuerpos que inhibían la quimiotaxis inducida por MCP-1 se ensayaron para la unión a quimeras de CCR2 para mapear sus epítomos. Esto se logró mediante la evaluación de la unión de los anticuerpos a células 300-19 que expresan diferentes quimeras de receptor que consisten en sustituciones en bucle extracelular (1^o, 2^o y/o 3^o) y N-terminales del CCR2 con partes de CCR1 (M = CCR2, R = CCR1).

Construcción de receptor quimera MRRR

25 **[0265]** El receptor quimérico MRRR (N-terminal de CCR2 (M), 1er, 2^o y 3er bucle extracelular de CCR1 (R)) se construyó usando el kit de mutagénesis dirigida de sitio QUICKCHANGE® de Stratagene y los siguientes cebadores de mutagénesis para mutar el primer sitio de enzima de restricción ApaI en CCR1 humano de tipo natural, se clonó en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) a un sitio BamHI utilizando los siguientes cebadores:

cebador de sentido 40A:

CGAGAGGGCCTTTGGGATCCAACCTGCTGCC (SEQ ID NO: 132)

30 Cebador anti-sentido 40B:

GGCAGCAGTTGGATCCCAAGGCCCTCTCG (SEQ ID NO: 133)

[0266] El receptor quimérico que contiene una quimera MMRR etiquetada con FLAG (N-terminal y 1er bucle extracelular de CCR2, 2^o y 3er bucles extracelulares de CCR1) clonado en el vector de expresión derivado de pCMV-1 (Pharmacia; Piscataway, NJ) fue proporcionado por Israel Charo de J. David Gladstone Institutes. La construcción de la quimera MMRR (referida como "2211" por los autores) se describe en Monteclaro FS et al. (Methods in Enzymology 228: 70-84 (1997)). El primer sitio ApaI en la quimera fue mutado a un sitio BamHI usando los siguientes cebadores de mutagénesis:

Cebador de sentido: 41A:

GCAAATTGGGATCCAACCTCTGCC (SEQ ID NO: 134)

40 Cebador Anti-sentido 41B:

GGCAGGAGTTGGATCCCAATTTGC (SEQ ID NO: 135).

[0267] Cada clon mutado resultante se cortó con NdeI y BamHI. El fragmento que contiene el vector del mutante CCR1/pcDNA3 BamHI y el fragmento NdeI/BamHI de 632 pares de bases que contiene sólo el extremo N-terminal de CCR2 del plásmido MMRR/pCMV1 mutado se aislaron en gel y se ligaron juntos dando como resultado la quimera MRRR/pcDNA3.

[0268] El sitio de BamHI en la quimera MRRR fue retromutado a un sitio ApaI usando los siguientes cebadores de mutagénesis:

50 Cebador de Sentido 41C:

GCAAATTGGGGCCCAACTGCTGCC (SEQ ID NO: 136)

Cebador Anti-sentido 41D:

GGCAGCAGTTGGGCCCAATTTGC (SEQ ID NO: 137).

55 **[0269]** El fragmento MRRR completo se amplificó por PCR usando cebador de sentido 66C (SEQ ID NO: 138) homólogo a la región etiqueta FLAG del vector y el cebador anti-sentido 66D (SEQ ID NO: 139) homólogo al extremo 3' de CCR1 y que contiene un sitio HindIII.

Cebador de sentido 66C

CTCTTGCCAGGGTGTGGTCTCCGA (SEQ ID NO: 138)

60 Cebador anti-sentido 66D

GATCGAAGCTTTCAGAACCCAGCAGAGAGTTCATG (SEQ ID NO: 139)

[0270] Este fragmento se subclonó a continuación en los sitios PflmI y HindIII de una construcción retroviral derivada de pMIG (Van Parijs, L. et al, Immunity 11: 281-188 (1999)) (Figura 5), sustituyendo un gen insertado (una quimera ratón/humano) que estaba precedido por una etiqueta FLAG seguido por el sitio SalI y tenía eliminado el sitio internode entrada ribosomal-sitio mejorado de proteína verde fluorescente (IRESEGFP).

Construcción del receptor quimera RRRM y RMMR

[0271] Se produjeron receptores quiméricos RRRM (N-terminal, 1er y 2º bucles extracelulares de CCR1, y 3er bucle extracelular de CCR2) y RMMR (N-terminal y 3er bucle extracelular de CCR1, y 2º y 3er bucles extracelulares de CCR2) utilizando un procedimiento de PCR de dos etapas.

[0272] Para la quimera RRRM, el tercer bucle de CCR2 humano de tipo natural se amplificó primero por PCR utilizando los siguientes cebadores:

Cebador quimérico de sentido 89A:

GACTATACTTATTTCTGTTTTTCATTGTCATTCTCCTGAACACC (SEQ ID NO: 140)

Cebador Anti-sentido 81B:

CGCCAAGCTTCATTATAAACCAGCCGAGA (SEQ ID NO: 141).

[0273] El CCR2 humano de tipo natural se clonó en el vector de expresión derivado de retroviral pMIG como una plantilla. La región N-terminal hasta el segundo bucle extracelular se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores:

Cebador de Sentido 89C:

ACGCGTCGACGAAACTCCAAACACCACAGAG (SEQ ID NO: 142)

Cebador Anti-sentido quimérico 89B:

GTTCAGGAGAATGACAATGAAAACAGAAATAAGTATAGTC (SEQ ID NO: 143),

y el CCR1 de tipo natural se clonó en el vector de expresión pcDNA3 como plantilla.

[0274] Estos fragmentos se purificaron en gel, se combinaron y amplificaron por PCR juntos usando los cebadores de extremos 5' y 3': 89C (SEQ ID NO: 142) y 81B (SEQ ID NO: 141). El fragmento resultante se ligó en los sitios SalI/HindII del vector retroviral, pMIG que contenía una etiqueta FLAG N-terminal y que tenía eliminados IRESEGFP.

Construcción del receptor quimera RMMR

[0275] Del tercer bucle extracelular de CCR1 a la cola citoplásmica se amplificó por PCR usando CCR1 de tipo natural clonado en el vector de expresión pcDNA3 como plantilla y los siguientes cebadores:

Cebador de sentido quimérico 85A:

TCATTCTCCTGAACACCTTCCAAGACTTCCTGTTCCACCCA (SEQ ID NO: 144)

Cebador anti-sentido 78D:

GCCAAGCTTCCAGTGTGATGGATATCTGA (SEQ ID NO: 145),

que se hibrida con un área del vector 3' del inserto en el plásmido CCR1/pcDNA3 de tipo natural.

[0276] Un segundo fragmento se amplificó por PCR que contenía el extremo N-terminal de CCR1 y una zona que contenía el primer y segundo bucles extracelulares de CCR2 usando un plásmido RMMM/pcDNA3 etiquetado con FLAG obtenido de Israel Charo de los Institutos J. David Gladstone como modelo. La construcción del constructo quimera RMMM (referido como "2111" por los autores) se describe en Monteclaro, FS et al. (Methods in Enzymology 228: 70-84 (1997)). Los cebadores utilizados fueron cebador de sentido 66C (SEQ ID NO: 138), que se hibrida a la etiqueta FLAG y el cebador quimérico antisentido 85B:

TGGGTGAACAGGAAGTCTTGAAGGTGTTCCAGGAGAATGA (SEQ ID NO: 146).

Estos dos fragmentos se purificaron en gel, se combinaron y amplificaron juntos por PCR usando el cebador de extremos 3' y 5': 66C (SEQ ID NO: 138) y 78D (SEQ ID NO: 144).

[0277] Este fragmento final se digirió con PflmI y HindIII y se ligó en el vector retroviral pMIG que contenía una etiqueta FLAG N-terminal y al que se eliminó IRESEGFP.

Expresión de la quimera

[0278] El retrovirus se produjo a partir de cada constructo quimera y se utilizó para transducir células 300-19. La expresión se determinó mediante análisis de FACS usando el anticuerpo anti-epítipo FLAG M1 (Sigma; St. Louis, MO, nº de catálogo F3040).

EJEMPLO 8

Mapeo de epítomos

5 **[0279]** La unión de los anticuerpos a los receptores quiméricos CCR2/CCR1 se evaluó mediante análisis FACS. Todos los receptores se marcaron en el extremo N-terminal con FLAG y también se tiñeron con el anticuerpo anti-FLAG M1 de tal manera que la expresión del receptor pudiera ser confirmada. Las figuras 6A y B ilustran la tinción con FACS de FLAG en el extremo N-terminal con el anticuerpo M1 (Figura 6A) en comparación con la tinción de 4.40 (Figura 6B). La Figura 6C ilustra una curva de unión del anticuerpo 4.40 A68G S230P en células 300-19 transfectadas con quimera RMMR. La unión de saturación del anticuerpo 4.40 A68G S230P a células 300-19 no transfectadas con CCR2 no mostraron unión a concentraciones de hasta 10 ug/ml (Figura 7A), mientras que células 300-19 transfectadas con CCR2 completamente humano mostraron unión en función de la dosis a concentraciones superiores a 0,01 ug/ml (Figura 7B). Por otra parte, la unión de saturación del anticuerpo 4.40 A68G S230P a receptores quiméricos que expresan sólo el N-terminal de CCR2 (MRRR) junto con las 3 regiones de bucle de CCR1 (Figura 7C) o el tercer bucle extracelular de CCR2 con el N-terminal y la 1ª y 2ª regiones de bucle de CCR1 (RRRM) no mostraron ninguna unión significativa a concentraciones de hasta 10 ug/ml (Figura 7D). Por el contrario, la unión de saturación del anticuerpo 4.40 A68G S230P a receptores quiméricos que expresan el N-terminal y 3ª región de bucle de CCR1 y la 1ª y 2ª región de bucle de CCR2 (RMMR) mostraron una unión en función de la dosis significativa a concentraciones superiores a 0.001 ug/ml (Figura 7E). La expresión del receptor en todos estos transfectantes del receptor se confirmó mediante la evaluación de la tinción de FLAG en el extremo N-terminal con un anticuerpo M1 (Sigma # F3040).

20

Tabla 7: Mapeo de epítomos

Clon	CCR2 de longitud completa (MMMM)	N-terminal de CCR2 (MRRR)	1º, 2º, 3º y 4º bucle de CCR2 (RMMM)	1º y 2º bucle de CCR2 (RMMR)	Quimiotaxis IC50 (µg/ml)	Epítopo
4.40.2	+	-	+	+	0,130	1º/2º bucle
4.9.2	+	-	+	+	0,198	1º/2º bucle
4.52.3	+	+	-		0,642	N-terminal
4.22.3	+	-	+	-	0,137	3er bucle
4.6.3	+	+	+		0,400	complejo*
4.48.3	+	+	+		0,491	complejo
4.3.1	+	+	+		0,618	complejo
4.59.2	+	+	+		1,020	complejo
4.41.1	+	-	-		0,521	complejo
4.24.3	+	-	-		2,264	complejo
4.39.3	+	-	-	-	0,139	complejo

* complejo = se une a tipo natural, pero no se une a las quimeras

ELISA de péptidos

25

[0280] Además, también se evaluó la unión de epítopo al primer y/o segundo bucle de CCR2 utilizando un ELISA de péptidos. Se lavó una placa ELISA de alta capacidad de unión recubierta Reacti-bind NEUTRAVIDIN® (Pierce; Rockford, IL) 3 veces con PBS/0,05% de Tween 20 y después se recubrió con 100 ul/pocillo de 6 ug/ml de péptido de bucle 2 de CCR2 biotinilado (SEQ ID NO: 129) o bucle 3 de CCR2 biotinilado (SEQ ID NO: 130) (AnaSpec; San Jose, CA). La placa se incubó durante 1 hora y después se lavaron 3 veces. El anticuerpo antagonista de CCR2 4.40.3 A68G S230P u otro anticuerpo primario, diluido en PBS/0,1% de BSA/0,05% de Tween 20, se añadió a continuación a la placa en una dilución en serie y se incubó durante 1 hora, al igual que otros controles. La placa se lavó 3 veces y se añadieron 100 ul/pocillo de anticuerpo secundario IgG4 anti-humano de HRP-ratón. (Zymed; So. San Francisco, CA) a todos los pocillos a una dilución 1: 5000 y se incubaron durante 1 hora. Se lavó la placa 3 veces y se añadió sustrato de TMB a todos los pocillos y se incubó durante ~ 30 minutos. La reacción de color se detuvo con 2M H₂SO₄ y la lectura de la absorbancia se midió en un lector de placas a 450 nm (Figura 8). Se identificaron los anticuerpos, incluyendo los anticuerpos 4.9 y 4.40, que se unían al segundo péptido del bucle extracelular del receptor y que no se unieron al tercer bucle.

30

35

EJEMPLO 9

40

Selectividad de unión

[0281] La selectividad del anticuerpo 4.40 A68G S230P para CCR2 humano se confirmó por la ausencia de la unión a un receptor de quimioquina estrechamente relacionado, CCR5, tal como se muestra en la figura 9 y por la falta de inhibición

de la quimiotaxis inducida por el ligando de CCR5/CCR1 MIP-1a (Figura 3). Un anticuerpo anti-CCR5 (Pharmingen, nº de catálogo 555992) se unió a las células que expresan CCR5 (Figura 9b), mientras que el anticuerpo de CCR2 4.40.3 A68G S230P no mostró unión a estas mismas células (Figura 9a). Para estos estudios, se incubaron células 300.19 modificadas para expresar CCR5 con el anticuerpo selectivo de CCR2, 4,40 A68G S230P, o el anticuerpo selectivo de CCR5 durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron en tampón FACS (azida de sodio al 0,02%, 2% de suero fetal bovino inactivado por calor en PBS) y se analizaron para la expresión en la superficie celular usando un citómetro de flujo utilizando procedimientos estándar.

EJEMPLO 10

Movilización de calcio

[0282] Para determinar si el anticuerpo 4.40 actúa como un antagonista funcional en CCR2 y no posee propiedades agonistas significativas, se examinaron los efectos de 4.40.3 sobre la movilización de calcio de células 300-19 transfectadas con CCR2, tal como se describe anteriormente (Gladue RP et al., J Biol Chem 278: 40473-40480 (2003)). Las células 300-19 transfectadas con CCR2 humanas se centrifugaron y se resuspendieron a 2×10^6 células/ml con tampón de PTI (HBSS (Gibco, Grand Island, NY) con Hepes 10 mM (Gibco) y 4,0 mM de CaCl_2 (Sigma; St. Louis, MO)). Las células se cargaron con 2 μl de indo-1 AM (Molecular Probes; Eugene, OR) por ml (2 μM final) y se incubaron durante 25 minutos a 37°C. A continuación, las células se lavaron 2 veces con tampón de PTI y se suspendieron a 1×10^7 /ml. Se añadieron varias concentraciones del anticuerpo o controles apropiados a las células y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A una cubeta cuadrada de 1 mm (Sarstedt; Alemania), se añadieron 1,8 ml de tampón de PTI precalentado junto con 200 μl de la suspensión celular. Las células se excitaron y se midió la fluorescencia usando un equipo de Photon Technology Corporation International (PTI; Lawrenceville, NJ). Se hizo una pausa en la máquina y se añadieron 20 μl de 100 nM MCP-1 (Peptidech; Rocky Hill, NJ). Después de la respuesta, se añadieron los siguientes reactivos en este orden para liberar y quelar el calcio total: 20 μl de 18% de Triton X-100; 20 μl de 3M Tris pH 8,5; 20 μl de 0,5 M EGTA pH 8,5 (todos de Sigma). El anticuerpo 4.40 inhibía la capacidad de MCP-1 para inducir la movilización de calcio de una manera dependiente de la dosis (Figura 10). Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

EJEMPLO 11

Inhibición de la quimiotaxis hacia CCL2 y CCL7

[0283] Para determinar si la inhibición de la quimiotaxis por el anticuerpo 4.40 A68G S230P es específica para MCP-1 o si también se aplica a otros ligandos de CCR2, se comparó la quimiotaxis de las células THP-1 hacia MCP-1 (CCL2) con hacia CCL3 (MIP-1a), tal como se muestra en la figura 3. Además se evaluó también la migración de células 300-19 transfectadas con CCR2 hacia otro ligando de CCR2, CCL7 (MCP-3) en presencia de anticuerpo 4,40 A68G S230P utilizando un ensayo de quimiotaxis similar al descrito en el Ejemplo 6. Mientras que el anticuerpo 4.40 A68G S230P inhibe la quimiotaxis hacia ambos ligandos de CCR2 conocidos, CCL2 (figura 3) y CCL7 (figura 11), la figura 3 muestra que no bloquea la quimiotaxis hacia el ligando de CCR1/CCR5, CCL3 (MIP-1a).

EJEMPLO 12

Polimerización de actina en monocitos

Polimerización de actina de sangre entera humana

[0284] El anticuerpo monoclonal 4.40 A68G S230P también se ensayó por su capacidad para inhibir la polimerización de la actina en sangre entera humana, tal como se muestra en la figura 12. La sangre se recogió en tubos vacutainer con EDTA (VWR; Boston, MA) y después se incubaron con diluciones de anticuerpo o control de KLH durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron control de tampón o 10 μl de 100 nM de MCP-1 (Peptidech; Rocky Hill, NJ) a una placa Corning de 48 pocillos (VWR). A continuación, se añadieron 100 μl de sangre con un mezclado suave y se incubaron durante 40 segundos, después de lo cual la reacción se detuvo con 0,8 ml de reactivo de parada/lisis (10% de solución de lisis FACS (Becton Dickinson; San Jose, CA), 20% de paraformaldehído al 16% (Electron Microscopy Sciences; Ft. Washington, PA), y 70% de H_2O). La placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó, y las células se transfirieron a una placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos y se lavó 2 veces con PBS. Se añadieron 100 μl de PBS por pocillo. A continuación, se añadieron 50 μl de reactivo de tinción (10% de 5 mg/ml de lisofosfotidilcolina (Sigma) en 10X HBSS, 80% del paraformaldehído al 16%, y 10% de 6,6 μM de NBD falacidina (Molecular Probes; Eugene, OR)). Las células se tiñeron durante una hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS que contenían 2% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT) y la

fluorescencia se cuantificó en un FACScan (Becton Dickinson) en monocitos. Como se muestra en la Figura 12, el anticuerpo 4.40 A68G S230P inhibió la polimerización de actina con una IC_{50} de 0,168 μ g/ml.

Polimerización de actina de sangre entera de mono Cynomolgus

5

[0285] La sangre se recogió en tubos vacutainer con EDTA (VWR; Boston, MA) y después se incubó con diluciones de anticuerpo o isotipo de control durante 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo, se añadieron 10 μ l de 100 nM MCP-1 (PeproTech; Rocky Hill, NJ; concentración final 10 nM) o tampón de control (HBSS sin Ca^{+2} o Mg^{+2} (Gibco; Grand Island, NY) y 0,2% de BSA (Sigma; St. Louis, MO)) a una placa Corning de 48 pocillos (VWR). A continuación, se añadieron 100 μ l de sangre con un mezclado suave y se incubó durante 40 segundos. La reacción se detuvo con 0,8 ml de reactivo de parada/lisis (10% de solución de lisis FACS (Becton Dickinson; San Jose, CA), 20% de paraformaldehído al 16% (Electron Microscopy Sciences; Ft. Washington, PA), y 70% de H_2O). La placa se incubó durante 10 minutos, se centrifugó y se lavó 2 veces con PBS. A continuación, las células se tiñeron durante una hora a temperatura ambiente en la oscuridad con reactivo de tinción (10% de 5 mg/ml de lisofosfolidilcolina (Sigma) en 10X HBSS, 80% de paraformaldehído al 16%, y 10% de 6,6 μ M NBD falacida (Molecular Probes; Eugene, OR)). Después de la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS que contenía 2% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT) y la fluorescencia se cuantificó en un FACScan (Becton Dickinson) en monocitos activados. Tal como se muestra en la Figura 13, el anticuerpo 4.40 A68G S230P inhibía la polimerización de actina de sangre entera en el mono cynomolgus con una IC_{50} de 0,49 μ g/ml.

EJEMPLO 13

Ensayo de cuantificación de ARNm de colágeno I

[0286] Se desarrolló una línea de células estrelladas hepáticas humanas, LI-90 (JCRB Cellbank, Japón) en matraces que contenían medio DME suplementado con 10% FBS desactivado, 100 U/ml de penicilina/100 μ g/ml de estreptomina y 2 mM L-Gln (Invitrogen) a 37°C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5%. Las células se cultivaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo durante 3 días y se trataron con 1000 nM de MCP-1 (PeproTech) y diversas concentraciones de 4,40 A68G S230P durante 48 horas a 37°C. El medio de cultivo se extrajo y las células se lisaron mediante la adición de 100 μ l de tampón de lisis suministrado con el kit de expresión QUANTIGENE® (Panomics). El ensayo de ADN ramificado se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de ARN total se cargaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía tampón de hibridación y 50 fmol/ μ l del conjunto de sondas Col1A1/GAPDH. Los ARNm capturados se hibridaron a moléculas de ADN ramificadas que contenían moléculas de fosfatasa alcalina mediante incubación a 46°C durante 60 min. Después de una incubación adicional con el sustrato quimioluminiscente a 46°C durante 30 min, la luminiscencia se cuantificó con un luminómetro (ARVOsx, Perkin Elmer; Massachusetts, EE.UU.). Se calculó la relación de la luminiscencia de Col1A1 frente a GAPDH, y los datos se analizaron mediante software Prism 4.0 para determinar valores de IC_{50} (GraphPad). Como se muestra en la figura 14, 4.40 A68G S230P inhibía la síntesis de ARNm de colágeno IAI en células LI90 inducidas por MCP-1 con un valor IC_{50} de 0,89 μ g/ml (6,2 nM).

EJEMPLO 14

Fosforilación de pERK

[0287] Se aisló sangre entera humana fresca de voluntarios sanos. El análisis FACS indicó un alto nivel de fosforilación de la quinasa regulada por señal extracelular (pERK) en monocitos CD14+ 6 min después de la adición de MCP-1. 4.40 A68G S230P inhibió la fosforilación de pERK inducida por MCP-1 en sangre entera de una manera dependiente de la dosis (Figura 15). La fosforilación de pERK en monocitos después de la estimulación ex vivo con MCP-1 se puede utilizar como un biomarcador de mecanismo, facilitando de este modo la farmacología PK/PD y de traducción. Los valores de IC_{50} e IC_{90} obtenidos para el anticuerpo 4.40 A68G S230P en este ensayo de sangre entera fueron 0,44 μ g/ml (2,9 nM) y 0,89 μ g/ml (6,1 nM), respectivamente.

EJEMPLO 15

Modelo murino de hepatitis aguda

55

[0288] La eficacia del anticuerpo 4.40 A68G S230P también se examinó usando un modelo ConA de ratón con hepatitis aguda. Para este estudio, se utilizaron ratones transgénicos en los que el CCR2 de ratón había sido sustituido por CCR2 humano, ya que el anticuerpo 4.40 A68G S230P no reconoce el CCR2 de roedores. Los animales recibieron una única inyección intraperitoneal del mAb a 0,1, 0,3 o 1,0 mg/kg en solución salina. Un anticuerpo de control de isotipo IgG 4 se administró a un grupo separado. Treinta minutos más tarde, a los animales se les administró una inyección iv en la vena de la cola (0,1 ml) de 15 mg/kg ConA en solución salina libre de pirógenos. Un grupo de control recibió solución salina sin

60

ConA. Después de 24 horas, se obtuvieron muestras de sangre y se analizaron las enzimas hepáticas del plasma. Como se muestra en la Figura 16, ALT y AST fueron marcadamente elevados en el grupo de anticuerpo de control con valores cercanos a 25.000 U/L. Por el contrario, los ratones tratados con 0,5 y 1,0 mg/kg de 4,40 A68G S230P mostraron una reducción significativa de sus enzimas hepáticas en plasma en aproximadamente un 50% y 80%, respectivamente.

5

EJEMPLO 17

Efectos terapéuticos en modelos de enfermedades en animales

10 Inflamación

[0289] Los efectos terapéuticos de los anticuerpos anti-CCR2 humano o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo los anticuerpos 4.40 y 4.9, se examinan usando modelos de mamíferos in vivo de la inflamación. Se monitoriza la infiltración de leucocitos tras la inyección intradérmica de una quimoquina, tal como MCP-1, y un anticuerpo o fragmento del mismo reactivo con CCR2 de mamífero, tal como el anticuerpo 4.40, en un animal adecuado, tal como conejo, ratón, rata, cobaya o macaco rhesus (véase por ejemplo, Van Damme, J. et al, J. Exp Med 176: 59-65 (1992); Zachariae, COC et al, J. Exp Med 171: 2177-2182 (1990); Jose, PJ et al, J. Exp Med.179: 881-887 (1994)). Las biopsias de piel se evalúan histológicamente para la infiltración de leucocitos (por ejemplo, eosinófilos y granulocitos). Se espera que los anticuerpos anti-CCR2 antagonistas disminuirán la infiltración de leucocitos en comparación con los animales de control.

20

Esclerosis múltiple

[0290] Los efectos terapéuticos de los anticuerpos o fragmentos de los mismos, incluyendo los anticuerpos 4.40 y 4.9, se prueban utilizando modelos de mamíferos in vivo de la esclerosis múltiple. La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad inflamatoria mediada por células T del sistema nervioso central (CNS) que sirve como un modelo animal para la esclerosis múltiple (MS) (véase Steinman L, Neuron 24: 511-514 (1999)). En el día 0 y el día 7 después de la inmunización (p.i.) con péptido encefalitogénico MOG₃₅₋₅₅, los ratones C57/J129 y/o C57BL/6 se sensibilizan para EAE activa por inyección subcutánea (s.c.) (dos sitios, dorsal flanco) con una total de 600 ug de MOG₃₅₋₅₅ encefalitogénico emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco, Detroit, MI), que contenía 70 ug de *Mycobacterium tuberculosis*, H37Ra (Difco). En el día 0 y el día 2 p.i., cada ratón recibe también 500 ng de toxina pertussis (PTX; List Biological Laboratories, Campbell, CA) por vía intravenosa (i.v.) a través de una vena de la cola. Algunos animales también reciben una dosis escalada de anticuerpos antagonistas anti-CCR2, tales como el anticuerpo 4.40. Los animales se evalúan diariamente para detectar signos clínicos y se evalúan de acuerdo con la siguiente escala: grado 0, no hay anomalías; grado 1, cola débil; grado 2, cola flácida y debilidad en las extremidades traseras; grado 3, parapesia de las extremidades posteriores; grado 4, tetraplejia; y el grado 5, moribundos o muerte.

35

[0291] Además, se realizan estudios con microscopía óptica en muestras de tejido fijadas con glutaraldehído/osmio desde el nervio óptico, cerebro, cerebelo y médula espinal. Las muestras de tejido se deshidratan y se embeben en resina epoxi a partir de la cual se cortan y se tiñen con azul de toluidina secciones de 1 µm. La inflamación, desmielinización, degeneración walleriana (WD), y la remielinización se califican en una escala de 0 a 5, como se ha descrito previamente (Cannella et al, Proc Natl Acad Sci USA. 95: 10100-10105 (1998)). Se espera que los ratones tratados con anticuerpos anti-CCR2 antagonistas exhibirán señales reducidas de anomalías clínicas, inflamación, desmielinización y WD sobre los animales de control. Se espera además que dicha reducción se producirá de una manera dependiente de la dosis.

45 Dolor neuropático

[0292] Los efectos terapéuticos de los anticuerpos o fragmentos de los mismos, incluyendo los anticuerpos 4.40 y 4.9, se examinan utilizando modelos de mamíferos in vivo de dolor neuropático. Se dividen ratones C57BL en dos grupos. El grupo experimental se administra con anticuerpos anti-CCR2 antagonistas diariamente, tal como el anticuerpo 4.40, a través de inyección en vena de cola, mientras que a un segundo grupo no se administra el anticuerpo. Los dos grupos se ensayan a intervalos de tiempo después del inicio del tratamiento en los siguientes ensayos:

50

Barra de rotación. Inicialmente, los ratones son entrenados en una barra de rotación durante 3 min a una velocidad de 10 rpm. Para las pruebas, se ajusta la velocidad a 10 rpm durante 60 s y posteriormente se acelera a 600 rpm. Se registra el tiempo necesario para que los ratones caigan después del inicio de la aceleración.

55

[0293] **Placa caliente.** Los ratones se habitúan al aparato de placa caliente con la temperatura ajustada a 45°C durante 2 min. Posteriormente, los ratones se colocan en la placa caliente y la temperatura se cambia secuencialmente hasta 52,5°C y 55,5°C (punto de corte fijado en 30 s) cada uno y luego a 58,5°C (punto de corte fijado en 20 s). Se registra el tiempo necesario para que los ratones se laman sus patas o salten.

60

[0294] **Prueba de formalina.** Durante 4 días antes de la prueba, los ratones se aclimataron durante 2 horas cada día en la plataforma de pruebas. En el día del estudio, los ratones se colocaron durante 1 hora en la plataforma de pruebas y, posteriormente, se les administraron 10 µl de 2% de formalina en la superficie plantar de la pata izquierda. Se registra el tiempo que los ratones pasan lamiendo o levantando la pata inyectada durante periodos de 2 minutos a intervalos de 5 minutos durante 50 min.

[0295] **Estimulación térmica y mecánica.** La sensibilidad térmica se evalúa midiendo las latencias de retirada de la pata a un estímulo de calor radiante (Hargreaves et al, Pain 32: 77-88 (1988)). La sensibilidad mecánica se determina con filamentos de von Frey calibrados mediante el uso del paradigma de arriba y abajo (Chaplan et al., J. Neurosci. Methods 53, 55-63 (1994)).

[0296] **Lesión nerviosa.** Los ratones se anestesian con una mezcla de ketamina (50 mg/kg, im) y medetomidina (1 mg/kg, im). Se realiza una incisión justo por debajo del hueso de la cadera, de forma paralela al nervio ciático. El nervio queda expuesto y cualquier tejido adherido se extrae del nervio. Se realiza una ligadura apretada con sutura de seda 6-0 alrededor de un tercio a la mitad del diámetro del nervio ciático. Los músculos se cierran con hilo de sutura y la herida, con grapas para heridas. La respuesta de los ratones a la estimulación mecánica se prueba antes y hasta 15 días después de la lesión del nervio.

[0297] Se espera que los ratones tratados con anticuerpos antagonistas anti-CCR2 exhibirán señales reducidas de dolor neuropático en comparación con los ratones control.

Tabla 8: Secuencias de CDR (SEQ ID NO:)

Anticuerpo	V _H CDR1	V _H CDR2	V _H CDR3	V _L CDR1	V _L CDR2	V _L CDR3
4.9	12	13	14	30	31	32
4.22	48	49	50	66	67	68
4.40	84	85	86	102	103	104
4.39	177	178	179	195	196	197

LISTADO DE SECUENCIAS

[0298]

<110> Pfizer Inc

<120> Anticuerpos CCR2

<130> PC032985

<160> 203

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1350

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

caggTgcagc tggTggagtc tgggggaggc gtggTccagc ctgggaggTc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca Tgcactgggt cgcCaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt caaacatatg atggaagaaa taaatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa aacgttgTat      240
ctgcaaatga acagactgag agctgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagatcag      300
cgtactgga agtactttga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc      360
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc      420
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggTgacg      480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tGtcctacag      540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg      600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggTgga caagagatt      660
gagtccaaat atgggtcccc atgcccata tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca      720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag      780
gtcacgtgcg tggTggTgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggTac      840
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc      900
    
```

ES 2 658 117 T3

	acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgct	ctgcaccagg	actggctgaa	cggcaaggag	960
	tacaagtgca	aggtctccaa	caaaggcctc	ccgtcctcca	tcgagaaaac	catctccaaa	1020
	gccaaagggc	agccccgaga	gccacagggtg	tacaccctgc	ccccatccca	ggaggagatg	1080
5	accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctaccccag	cgacatcgcc	1140
	gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	1200
	gactccgacg	gctccttctt	cctctacagc	aggctaaccg	tggacaagag	caggtggcag	1260
	gaggggaatg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgcacaacca	ctacacacag	1320
	aagagcctct	ccctgtctct	gggtaaatag				1350
10	<210>	2					
	<211>	366					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
15	<400>	2					
	caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
	tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agttatggca	tgcactgggt	ccgccaggct	120
	ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	caaacatatg	atggaagaaa	taaatactat	180
	gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	aacgttgtat	240
20	ctgcaaatga	acagactgag	agctgaggac	acggctgtgt	attattgtgc	gagagatcag	300
	gcgtactgga	agtactttga	tgcttttgat	atctggggcc	aagggacaat	ggtcaccgct	360
	tcttca						366
25	<210>	3					
	<211>	15					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
30	<400>	3					
	agttatggca	tgcac					15
35	<210>	4					
	<211>	51					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
40	<400>	4					
	gttcaaacat	atgatggaag	aaataaatac	tatgcagact	ccgtgaaggg	c	51
45	<210>	5					
	<211>	39					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
50	<400>	5					
	gatcaggcgt	actggaagta	ctttgatgct	tttgatatc			39
55	<210>	6					
	<211>	90					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
60	<400>	6					
	caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
	tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt				90
65	<210>	7					
	<211>	42					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
70	<400>	7					
	tgggtccgcc	aggctccagg	caaggggctg	gagtggggtg	ca		42

ES 2 658 117 T3

```

<210> 8
<211> 96
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens

<400> 8
cgattcacca tctccagaga caattccaag aaaacgttgt atctgcaaat gaacagactg 60
agagctgagg acacggctgt gtattattgt gcgaga 96

10
<210> 9
<211> 33
<212> ADN
15 <213> Homo sapiens

<400> 9
tggggccaag ggacaatggt caccgtctct tca 33

20
<210> 10
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 10
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser 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 Gln Thr Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80
35 Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Lys Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110
40 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
45 Val Ser Trp Asn Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
50 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220
Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
55 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270
60 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

```

ES 2 658 117 T3

305 Tyr Lys Cys Lys Val 310 Ser Asn Lys Gly Leu 315 Pro Ser Ser Ile Glu 320 Lys
 Thr Ile Ser Lys 325 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 335 Tyr Thr
 5 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 10 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 15 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys
 20
 <210> 11
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 11
 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 35 40 45
 Ala Val Gln Thr Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40 Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Lys Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 45
 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 12
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5
 55
 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 13
 Val Gln Thr Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

ES 2 658 117 T3

```

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 14
Asp Gln Ala Tyr Trp Lys Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10
10
<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15
<400> 15
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
20 25 30
20
<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25
<400> 16
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10
30
<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35
<400> 17
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
40
<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
45
<400> 18
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
50
<210> 19
<211> 645
<212> ADN
<213> Homo sapiens
55
<400> 19
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctacat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaatt ccccgtgcag ttttgccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa gaacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480

```

ES 2 658 117 T3

	gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
	ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
	ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gttag		645
5	<210>	20					
	<211>	321					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
10	<400>	20					
	gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctacat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
	atcacttgcc	gggcaagtca	gagcattagc	agctatttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
	gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
	aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
15	gaagatthg	caacttacta	ctgtcaacag	agttacaatt	ccccgtgcag	ttttggccag	300
	gggaccaagc	tggagatcaa	a				321
	<210>	21					
	<211>	33					
20	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	21					
25	cgggcaagtc	agagcattag	cagctattta	aat			33
	<210>	22					
	<211>	21					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
30	<400>	22					
	gctgcatcca	gtttgcaaag	t				21
	<210>	23					
35	<211>	27					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	23					
40	caacagagtt	acaattcccc	gtgcagt				27
	<210>	24					
	<211>	69					
	<212>	ADN					
45	<213>	Homo sapiens					
	<400>	24					
50	gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctacat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
	atcacttgc						69
	<210>	25					
	<211>	45					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
55	<400>	25					
	tggtatcagc	agaaaccagg	gaaagcccct	aagctcctga	tctat		45
	<210>	26					
60	<211>	96					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					

```

<400> 26
ggggtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc      60
agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgt                                     96

5  <210> 27
    <211> 30
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

10  <400> 27
    tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa                                     30

    <210> 28
    <211> 214
15  <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 28
20  Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ser Val Gly
    1      5      10      15
    Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
    20      25      30
    Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
    35      40      45
25  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
30  Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Ser Pro Cys
    85      90      95
    Ser 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
35  Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Lys 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
40  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
45  Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210

    <210> 29
    <211> 107
50  <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 29
55  Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ser Val Gly
    1      5      10      15
    Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
    20      25      30
    Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
    35      40      45
60  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

```


ES 2 658 117 T3

```

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 36
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

10 <210> 37
<211> 1350
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <400> 37
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactggat acgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg atcaacccta gtggtggtag cacaacctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
20 atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagagaga 300
tgggtataagt ggaacttcga tgtttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc tccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ctttcccggc tgcctacag 540
25 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660
gagtccaaat atggtcccc atgcccata tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacacttca tgatctccc gaccctgag 780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
30 ttggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacag 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgacccagg actggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctcaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
35 ttggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggtcaaccg tggacaagag caggtggcag 1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320
aagagcctct ccctgtctct gggtaaata 1350

40 <210> 38
<211> 366
<212> ADN
<213> Homo sapiens

45 <400> 38
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactggat acgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg atcaacccta gtggtggtag cacaacctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
50 atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagagaga 300
tgggtataagt ggaacttcga tgtttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttca 366

<210> 39
55 <211> 15
<212> ADN
<213> Homo sapiens

60 <400> 39
agctactata tgcac 15

<210> 40
<211> 51

```

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 40
 5 atgatcaacc ctagtggtag tagcacaacc tacgcacaga agttccaggg c 51

 <210> 41
 <211> 39
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 41
 gagagatggg ataagtggaa cttcgatggt tttgatatc 39

 <210> 42
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 42
 20 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg catctggata caccttcacc 90

 <210> 43
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 43
 30 tggatacgac aggccctgg acaagggctt gagtggatgg ga 42

 <210> 44
 <211> 96
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens

 <400> 44
 agagtcacct tgaccagggga cacgtccacg agcacagtct acatggacct gagcagcctg 60
 agatctgagg acacggccgt atattactgt gcgaga 96

 <210> 45
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 45
 45 tggggccaag ggacaatggt caccgtctct tca 33

 <210> 46
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 46
 55 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 60 Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

ES 2 658 117 T3

	65					70					75					80
	Met	Asp	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
5	Ala	Arg	Glu	Arg	Trp	Tyr	Lys	Trp	Asn	Phe	Asp	Val	Phe	Asp	Ile	Trp
				100					105					110		
	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
			115					120					125			
	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr
							135					140				
10	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
	145					150					155					160
	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170						175	
15	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180						185					190		
	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp
			195					200					205			
	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr
		210					215					220				
20	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro
	225					230					235					240
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245						250				255		
25	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp
				260					265					270		
	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
			275					280					285			
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
		290					295					300				
30	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
	305					310					315					320
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys
				325						330				335		
35	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				340					345					350		
	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
			355					360					365			
	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
		370					375					380				
40	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
	385					390					395				400	
	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
				405						410				415		
45	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				420					425					430		
	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly
			435					440					445			
	Lys															
50																
	<210>	47														
	<211>	122														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
55																
	<400>	47														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20					25					30		
60	Tyr	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
	Gly	Met	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe

ES 2 658 117 T3

50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 5 Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Val Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 10 <210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 48
 Ser Tyr Tyr Met His
 1 5
 20 <210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 49
 Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 30 <210> 50
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 50
 Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Val Phe Asp Ile
 1 5 10
 40 <210> 51
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 51
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 50 <210> 52
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 52
 Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10
 60 <210> 53
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 658 117 T3

<400> 53
 Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Asp
 1 5 10 15
 5 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 54
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 15

<210> 55
 <211> 648
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens

<400> 55
 gatgttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagccccgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
 25 cttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac 180
 gctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tgttgggttt tattacactg gccgatcgat caccgtcggc 300
 caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 30 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 56
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 gatgttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagccccgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac 180
 gctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 45 agcaggggtgg aggctgagga tgttgggttt tattacactg gccgatcgat caccgtcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 57
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 57
 aggtctagtc aaagccccgt atacagtgat ggaaacacct acttgaat 48

<210> 58
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 aaggtttcta actgggacgc t 21

ES 2 658 117 T3

<210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 59
 actggccgat cgatcacc 18
 <210> 60
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 60
 15 gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgc 69
 <210> 61
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 61
 25 tggcttcagc agaggccagg ccaatctcca aggcgcctaa tttat 45
 <210> 62
 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 62
 ggggtcccag acagattcag cggcagtggg tcaggcactg atttcacact gaaaatcagc 60
 aggtggagg ctgaggatgt tgggtttat tac 93
 35 <210> 63
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 63
 gtcggccaag ggacacgact ggagatataa 30
 <210> 64
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 64
 50 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 55 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ala Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Arg Ser
 85 90 95
 60 Ile Thr Val Gly Gln Gly Thr Arg Leu 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

ES 2 658 117 T3

5 Gly Thr Ala¹¹⁵ Ser Val Val Cys¹²⁰ Leu Leu Asn Asn Phe¹²⁵ Tyr Pro Arg Glu
 Ala Lys Val Gln Trp Lys¹³⁵ Val Asp Asn Ala Leu¹⁴⁰ Gln Ser Gly Asn Ser
 145 Gln Glu Ser Val Thr¹⁵⁰ Glu Gln Asp Ser Lys¹⁵⁵ Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 Ser Ser Thr Leu Thr¹⁶⁵ Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His¹⁷⁵ Lys Val
 10 Tyr Ala Cys¹⁸⁰ Glu Val Thr His Gln¹⁸⁵ Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 Ser Phe¹⁹⁵ Asn Arg Gly Glu Cys²⁰⁰ 205
 Ser Phe²¹⁰ Cys²¹⁵

15 <210> 65
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 65
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 Gln Pro Ala Ser⁵ Ile Ser Cys Arg Ser¹⁰ Ser Gln Ser Pro Val Tyr Ser
 20 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp²⁵ Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 25 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ala Gly Val Pro
 50 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 Ser Arg Val Glu Ala⁷⁰ Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Arg Ser
 85 Ile Thr Val Gly⁸⁵ Gln Gly Thr Arg Leu⁹⁰ Glu Ile Lys
 100 105

35 <210> 66
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 66
 Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

45 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 67
 Lys Val Ser Asn Trp Asp Ala
 1 5

55 <210> 68
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <400> 68
 Thr Gly Arg Ser Ile Thr
 1 5

<210> 69

ES 2 658 117 T3

```

<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 69
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

10 <210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 70
Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

20 <210> 71
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 71
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr
20 25 30

30 <210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 72
Val Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
1 5 10

40 <210> 73
<211> 1350
<212> ADN
<213> Homo sapiens

45 <400> 73
caggTgcagc tggTggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggact caccttcagt agctatggca tgcactgggt cgcaccaggc 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattatatg atggaaagaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
50 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag 300
gcgtactgga cctactttga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag 540
55 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagt 660
gagtccaaat atgggtcccc atgccccatca tgccccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacgtgcg tggTggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
60 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaG acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900
acgtaccgtg tggTcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgctctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080

```

ES 2 658 117 T3

	accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctaccccag	cgacatcgcc	1140
	gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	1200
	gactccgacg	gctccttctt	cctctacagc	aggctaaccg	tggacaagag	caggtggcag	1260
	gaggggaatg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgcacaacca	ctacacacag	1320
5	aagagcctct	ccctgtctct	gggtaaatga				1350
	<210>	74					
	<211>	366					
	<212>	ADN					
10	<213>	Homo sapiens					
	<400>	74					
	caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
	tcctgtgcag	cctctggact	caccttcagt	agctatggca	tgcactgggt	ccgccaggct	120
15	ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atattatatg	atggaaagaa	taaatactat	180
	gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
	ctgcaaatga	acagcctgag	agctgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatcag	300
	gcgtactgga	cctactttga	tgcttttgat	atctggggcc	aagggacaat	ggtcaccgtc	360
20	tcttca						366
	<210>	75					
	<211>	15					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
25	<400>	75					
	agctatggca	tgcac					15
	<210>	76					
30	<211>	51					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	76					
35	gttatattat	atgatggaaa	gaataaatac	tatgcagact	ccgtgaaggg	c	51
	<210>	77					
	<211>	39					
	<212>	ADN					
40	<213>	Homo sapiens					
	<400>	77					
	gatcaggcgt	actggaccta	ctttgatgct	tttgatatc			39
45	<210>	78					
	<211>	90					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
50	<400>	78					
	caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
	tcctgtgcag	cctctggact	caccttcagt				90
	<210>	79					
55	<211>	42					
	<212>	ADN					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	79					
60	tgggtccgcc	aggctccagg	caaggggctg	gagtggggtg	ca		42
	<210>	80					
	<211>	96					

ES 2 658 117 T3

```

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 80
5 cgattcacca tctccagaga caattccaag aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg      60
  agagctgagg acacggctgt gtattactgt gcgaga                                96

<210> 81
<211> 33
10 <212> ADN
   <213> Homo sapiens

<400> 81
15 tggggccaag ggacaatggt caccgtctct tca                                33

<210> 82
<211> 449
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 82
  Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1      5      10
25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu 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 Leu Tyr Asp Gly Lys Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
  50      55      60
30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
  65      70      75
  Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
  80      85      90
  Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp
  95      100      105
35 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
  110      115      120
  Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
  125      130      135
40 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
  140      145      150
  Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
  155      160      165
  Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
  170      175      180
45 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
  185      190      195
  His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
  200      205      210
50 Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
  215      220      225
  Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
  230      235      240
  Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
  245      250      255
55 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
  260      265      270
  Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
  275      280      285
60 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
  290      295      300
  Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
  305      310      315
  Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
  320      325      330
  Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
  325      330      335

```

ES 2 658 117 T3

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 5 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 10 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 15 Lys

<210> 83
 <211> 122
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 25 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 Leu 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 35 40 45
 30 Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Lys Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 40

<210> 84
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 85
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85
 Val Ile Leu Tyr Asp Gly Lys Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

60 <210> 86
 <211> 13
 <212> PRT

```

<213> Homo sapiens

<400> 86
5 Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
  1           5           10

<210> 87
<211> 30
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 87
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
15 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser
  20           25           30

<210> 88
<211> 14
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
25 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
  1           5           10

<210> 89
<211> 32
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens

<400> 89
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
35 1           5           10           15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
  20           25           30

<210> 90
<211> 11
40 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90
45 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
  1           5           10

<210> 91
<211> 645
<212> ADN
50 <213> Homo sapiens

<400> 91
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120
gatcagtcct caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180
aggttcagtg gcagtgatc tgcgacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

```

ES 2 658 117 T3

<210> 92
 <211> 321
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 92
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgcc gggccagtca gagcattggg agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120
 10 gatcagtcctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagc ctttctcagg ggtcccctcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgcgacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

 15 <210> 93
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 93
 cgggccagtc agagcattgg tagtagctta cac 33

 <210> 94
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 94
 30 tatgcttccc agtccttctc a 21

 <210> 95
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 95
 catcagagta gtagtttacc gctcact 27

 <210> 96
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 40
 <400> 96
 45 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgc 69

 <210> 97
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 97
 55 tggtagcagc agaaaccaga tcagtctcca aagctcctca tcaag 45

 <210> 98
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 98
 ggggtcccct cgaggttcag tggcagtgga tctgcgacag atttcaccct caccatcaat 60
 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgt 96

ES 2 658 117 T3

<210> 99
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 99
 ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa 30

 10 <210> 100
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 100
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 25 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 30 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
 35 145 150 155 160
 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
 40 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

 45 <210> 101
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 50 <400> 101
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30
 55 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 60 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

ES 2 658 117 T3

```

                100                105

5  <210> 102
   <211> 11
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

10 <400> 102
    Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
    1          5          10

15 <210> 103
   <211> 7
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

20 <400> 103
    Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
    1          5

25 <210> 104
   <211> 9
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

30 <400> 104
    His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
    1          5

35 <210> 105
   <211> 23
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

40 <400> 105
    Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
    1          5          10          15
    Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
    20

45 <210> 106
   <211> 15
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

50 <400> 106
    Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
    1          5          10          15

55 <210> 107
   <211> 32
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

60 <400> 107
    Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr
    1          5          10          15
    Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
    20          25          30

```

<213> Homo sapiens

<400> 108
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 5 1 5 10

<210> 109
 <211> 645
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens

<400> 109
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgcc gggccagtca gagcattggg agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120
 15 gatcagtcct caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgaaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga 360
 20 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gctgtgtgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 110
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgcc gggccagtca gagcattggg agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120
 gatcagtcct caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
 35 gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 111
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 111
 ggggtcccct cgaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcaccct caccatcaat 60
 45 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgt 96

<210> 112
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 112
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 55 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 60 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu

ES 2 658 117 T3

5 Thr Phe Gly Gly 85 Thr Lys Val Glu 90 Ile Lys Arg Thr Val 95 Ala Ala
 Pro Ser Val 100 Phe Ile Phe Pro Pro 105 Ser Asp Glu Gln Leu 110 Lys Ser Gly
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 10 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly 185 Leu Ser Ser Pro Val 190 Thr Lys Ser
 15 Phe Asn Arg Gly Glu Cys 200 205 210

20 <210> 113
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 113
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 30 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 35 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 90 95 100 105

40 <210> 114
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 114
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

50 <210> 115
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <400> 115
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggact caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattatatg atggaagaa taaatactat 180
 60 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag 300
 gcgtactgga cctactttga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcacctgc 360
 tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgctc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420

ES 2 658 117 T3

His Glu Cys Glu Gln Ser Arg His Leu Asp Leu Ala Val Gln Val Thr
 305 310 315 320
 Glu Val Ile Ala Tyr Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala
 325 330 335
 5 Phe Val Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe His Arg
 340 345 350
 Arg Val Ala Val His Leu Val Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp
 355 360 365
 10 Arg Leu Glu Arg Val Ser Ser Thr Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu
 370 375 380
 Leu Ser Ala Gly Phe
 385

 <210> 118
 <211> 1167
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 118
 20 atggacagca aaggttcgtc gcagaaaggg tcccgcctgc tcctgctgct ggtggtgtca 60
 aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacgaa 120
 actccaaaca ccacagagga ctatgacacg accacagagt ttgactatgg ggatgcaact 180
 ccgtgccaga aggtgaacga gagggccttt ggggcccaac tcctgcctcc gctctactcg 240
 ctgggtgtca tctttggttt tgtgggcaac atgctggctg tcctcatctt aataaactgc 300
 25 aaaaagctga agtgcttgac tgacatttac ctgctcaacc tggccatctc tgatctgctt 360
 tttcttatta ctctccatt gtgggctcac tctgctgcaa atgagtgggt ctttgggaat 420
 gcaatgtgca aattattcac agggctgtat cacatcgggt attttggcgg aatcttcttc 480
 atcatcctcc tgacaatcga tagatacctg gctattgtcc atgctgtggt tgctttaaaa 540
 gccaggacgg tcacctttgg ggtggtgaca agtgtgatca cctggttggt ggctgtgttt 600
 30 gcttctgtcc caggaatcat ctttactaaa tgccagaaga aagattctgt ttatgtctgt 660
 ggcccttatt ttccacgagg atggaataat ttccacacaa taatgaggaa cttttgggg 720
 ctggctcctgc cgctgctcat catggctcat tgctactcgg gaatcctgaa aaccctgctt 780
 cggtgtcgaa acgagaagaa gaggcatagg gcagtgagag tcatcttcac catcatgatt 840
 gtttactttc tcttctggac tccctataac attgtcattc tcctgaacac cttccaagac 900
 35 ttctgtttca cccatgagtg tgagcagagc agacatttgg acctggctgt gcaagtgacg 960
 gagtgatcg cctacacgca ctgctgtgtc aaccagtgga tctacgcctt cgttgggtgag 1020
 aggttccgga agtacctgcg gcagttgttc cacagggctg tggctgtgca cctggttaaa 1080
 tggctcccct tcctctccgt ggacaggctg gagaggggtca gctccacatc tccctccaca 1140
 ggggagcatg aactctctgc tgggttc 1167

 <210> 119
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 119
 Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 50 Lys Asp Asp Asp Val Asp Glu Thr Pro Asn Thr Thr Glu Asp Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Gly Asp Ala Thr Pro Cys Gln Lys
 50 55 60
 Val Asn Glu Arg Ala Phe Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser
 65 70 75 80
 Leu Val Phe Val Ile Gly Leu Val Gly Asn Ile Leu Val Val Leu Val
 85 90 95
 60 Leu Val Gln Tyr Lys Arg Leu Lys Asn Met Thr Ser Ile Tyr Leu Leu
 100 105 110
 Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro Phe Trp
 115 120 125
 Ile Asp Tyr Lys Leu Lys Asp Asp Trp Val Phe Gly Asp Ala Met Cys

ES 2 658 117 T3

130 135 140
 Lys Ile Leu Ser Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe
 145 150 155 160
 Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala
 5 Val Phe Ala Leu Arg Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser
 165 170 175 180 185 190
 Ile Ile Ile Trp Ala Leu Ala Ile Leu Ala Ser Met Pro Gly Leu Tyr
 195 200 205
 10 Phe Ser Lys Thr Gln Trp Glu Phe Thr His His Thr Cys Ser Leu His
 210 215 220
 Phe Pro His Glu Ser Leu Arg Glu Trp Lys Leu Phe Gln Ala Leu Lys
 225 230 235 240
 15 Leu Asn Leu Phe Gly Leu Val Leu Pro Leu Val Met Ile Ile Cys
 245 250 255
 Tyr Thr Gly Ile Ile Lys Ile Leu Leu Arg Arg Pro Asn Glu Lys Lys
 260 265 270
 Ser Lys Ala Val Arg Leu Ile Phe Val Ile Met Ile Ile Phe Phe Leu
 275 280 285
 20 Phe Trp Thr Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Leu Ile Ser Val Phe Gln Glu
 290 295 300
 Phe Phe Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala
 305 310 315 320
 25 Thr Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro
 325 330 335
 Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu Ser Val
 340 345 350
 Phe Phe Arg Lys His Ile Thr Lys Arg Phe Cys Lys Gln Cys Pro Val
 355 360 365
 30 Phe Tyr Arg Glu Thr Val Asp Gly Val Thr Ser Thr Asn Thr Pro Ser
 370 375 380
 Thr Gly Glu Gln Glu Val Ser Ala Gly Leu
 385 390

35 <210> 120
 <211> 1182
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 120
 atggacagca aagggttcgtc gcagaaaggg tccgcctgctc tcctgctgct ggtggtgtca 60
 aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacgaa 120
 actccaaaca ccacagagga ctatgacacg accacagagt ttgactatgg ggatgcaact 180
 ccgtgccaga aggtgaacga gagggccttt ggggcccaac tgctgcccc tctgtactcc 240
 45 ttggtatttg tcattggcct gggtgaaac atcctggtgg tcctggtcct tgtgcaatac 300
 aagaggctaa aaaacatgac cagcatctac ctctgaacc tggccatttc tgacctgctc 360
 ttctgttca cgcttccctt ctggatcgac tacaagttga aggatgactg ggttttgggt 420
 gatgccatgt gtaagatcct ctctggggtt tattacacag gcttgtacag cgagatcttt 480
 ttcacatcc tgctgacgat tgacaggtac ctggccatcg tccacgccgt gtttgccttg 540
 50 cgggcacgga ccgtcacttt tgggtgtcatc accagcatca tcatttgggc cctggccatc 600
 ttggcttcca tgccaggctt atacttttcc aagacccaat ggaattcac tcaccacacc 660
 tgcagccttc actttcctca cgaaagccta cgagagtgga agctgtttca ggctctgaaa 720
 ctgaacctct ttgggctggt attgcctttg ttggtcatga tcatctgcta cacagggatt 780
 ataaagattc tgctaagacg accaaatgag aagaaatcca aagctgtccg tttgattttt 840
 55 gtcacatga tcatcttttt tctctttttg acccctaca atttgactat acttattttt 900
 gtttccagg aattcttcgg cctgagtaac tgtgaaagca ccagtcaact ggaccaagcc 960
 acgcaggatga cagagactct tgggatgact cactgctgca tcaatcccat catctatgcc 1020
 ttcgttgggg agaagttcag aaggatatctc tcggtgttct tccgaaagca catcaccaag 1080
 cgcttctgca aacaatgtcc agttttctac agggagacag tggatggagt gacttcaaca 1140
 60 aacacgcctt ccactgggga gcaggaagtc tcggctggtt ta 1182

<210> 121
 <211> 390

ES 2 658 117 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

5 Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu
 1 Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser Asp Tyr
 20 Lys Asp Asp Asp Val Asp Glu Thr Pro Asn Thr Thr Glu Asp Tyr
 10 Asp Thr Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Gly Asp Ala Thr Pro Cys Gln Lys
 50 Val Asn Glu Arg Ala Phe Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser
 65 Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val Leu Ile
 15 Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr Leu Leu
 100 Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro Leu Trp
 20 Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys
 130 Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile Phe Phe
 145 Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val
 25 Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr Ser Val
 180 Ile Thr Trp Leu Val Ala Val Phe Ala Ser Val Pro Gly Ile Ile Phe
 30 Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro Tyr Phe
 210 Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg Asn Ile Leu Gly
 225 Leu Val Leu Pro Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu
 35 Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val
 260 Arg Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Thr Pro
 40 Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu
 290 Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln Val Thr
 305 Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
 45 Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu Ser Val Phe Phe Arg Lys
 340 His Ile Thr Lys Arg Phe Cys Lys Gln Cys Pro Val Phe Tyr Arg Glu
 50 Thr Val Asp Gly Val Thr Ser Thr Asn Thr Pro Ser Thr Gly Glu Gln
 370 Glu Val Ser Ala Gly Leu
 385 390

<210> 122
<211> 1170
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 122

atggacagca aagggttcgtc gcagaaaggg tcccgcctgc tcctgctgct ggtggtgtca
 aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacgaa

60
120

ES 2 658 117 T3

	actccaaaca	ccacagagga	ctatgacacg	accacagagt	ttgactatgg	ggatgcaact	180
	ccgtgccaga	aggtgaacga	gagggccttt	ggggcccaac	tcctgcctcc	gctctactcg	240
	ctgggtgtca	tctttggttt	tgtgggcaac	atgctggctg	tcctcatctt	aataaactgc	300
	aaaaagctga	agtgcctgac	tgacatttac	ctgctcaacc	tggccatctc	tgatctgctt	360
5	tttcttatta	ctctcccat	gtgggctcac	tctgctgcaa	atgagtgggt	ctttgggaat	420
	gcaatgtgca	aattattcac	agggctgtat	cacatcggtt	atthttggcgg	aatcttcttc	480
	atcatcctcc	tgacaatcga	tagatacctg	gctattgtcc	atgctgtggt	tgctttaaaa	540
	gccaggacgg	tcacctttgg	gggtggtgaca	agtgtgatca	cctggttggt	ggctgtgttt	600
	gcttctgtcc	caggaatcat	ctttactaaa	tgccagaaag	aagattctgt	ttatgtctgt	660
10	ggcccttatt	ttccacgagg	atggaataat	ttccacacaa	taatgaggaa	cattttgggg	720
	ctggctcctgc	cgctgctcat	catggctcatc	tgctactcgg	gaatcctgaa	aaccctgctt	780
	cggtgtcgaa	acgagaagaa	gagggcatagg	gcagtgagag	tcattcttcac	catcatgatt	840
	gtttactttc	tcttctggac	tccttataac	attgtcattc	tcctgaacac	cttccaggaa	900
	ttcttcggcc	tgagtaactg	tgaagcacc	agtcaactgg	accaagccac	gcaggtgaca	960
15	gagactcttg	ggatgactca	ctgctgcac	aatcccatca	tctatgcctt	cgttggggag	1020
	aagttcagaa	ggatctctc	gggtgttcttc	cgaaagcaca	tcaccaagcg	cttctgcaaa	1080
	caatgtccag	ttttctacag	ggagacagtg	gatggagtga	cttcaacaaa	cacgccttcc	1140
	actggggagc	aggaagtctc	ggctggttta				1170
20	<210>	123					
	<211>	400					
	<212>	PRT					
	<213>	Homo sapiens					
25	<400>	123					
	Met Asp Ser	Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu					
	1	5	10	15	20	25	30
	Leu Val Val	Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser Asp Tyr					
30	Lys Asp Asp	Asp Asp Val Asp Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile					
	35	40	45	50	55	60	65
	Arg Asn Thr	Asn Glu Ser Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr					
	50	55	60	65	70	75	80
35	Asp Tyr Gly	Ala Pro Cys His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala					
	65	70	75	80	85	90	95
	Gln Leu Leu	Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val					
	80	85	90	95	100	105	110
40	Gly Asn Met	Leu Val Val Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys					
	100	105	110	115	120	125	130
	Cys Leu Thr	Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu					
	105	110	115	120	125	130	135
	Phe Leu Ile	Thr Leu Pro Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp					
	115	120	125	130	135	140	145
45	Val Phe Gly	Asn Ala Met Cys Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile					
	130	135	140	145	150	155	160
	Gly Tyr Phe	Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg					
	145	150	155	160	165	170	175
	Tyr Leu Ala	Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala Arg Thr Val					
	155	160	165	170	175	180	185
50	Thr Phe Gly	Val Ile Thr Ser Ile Ile Ile Trp Ala Leu Ala Ile Leu					
	175	180	185	190	195	200	205
	Ala Ser Met	Pro Gly Leu Tyr Phe Ser Lys Thr Gln Trp Glu Phe Thr					
	185	190	195	200	205	210	215
55	His His Thr	Cys Ser Leu His Phe Pro His Glu Ser Leu Arg Glu Trp					
	205	210	215	220	225	230	235
	Lys Leu Phe	Gln Ala Leu Lys Leu Asn Leu Phe Gly Leu Val Leu Pro					
	215	220	225	230	235	240	245
	Leu Leu Val	Met Ile Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys Ile Leu Leu					
	235	240	245	250	255	260	265
60	Arg Arg Pro	Asn Glu Lys Lys Ser Lys Ala Val Arg Leu Ile Phe Val					
	245	250	255	260	265	270	275
	Ile Met Ile	Ile Phe Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn Leu Thr Ile					
	265	270	275	280	285	290	295

ES 2 658 117 T3

290 295 300
 Leu Ile Ser Val Phe Gln Asp Phe Leu Phe Thr His Glu Cys Glu Gln
 305 310 315
 5 Ser Arg His Leu Asp Leu Ala Val Gln Val Thr Glu Val Ile Ala Tyr
 325 330 335
 Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Arg
 340 345 350
 Phe Arg Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe His Arg Arg Val Ala Val His
 355 360 365
 10 Leu Val Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp Arg Leu Glu Arg Val
 370 375 380
 Ser Ser Thr Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu Leu Ser Ala Gly Phe
 385 390 395 400

15 <210> 124
 <211> 1200
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 124
 atggacagca aaggttcgtc gcagaaaggg tcccgcctgc tcctgctgct ggtgggtgtca 60
 aatctactct tgtgccaggg tgtggctctc gattacaaag atgatgatga tgtcgacctg 120
 tccacatctc gttctcgggt taccagaaat accaacgaga gcggtgaaga agtcaccacc 180
 ttttttgatt atgattacgg tgctccctgt cataaatttg acgtgaagca aattggggcc 240
 25 caactcctgc ctccgctcta ctgctgggtg ttcattcttg gttttgtggg caacatgctg 300
 gtcgtcctca tcttaataaa ctgcaaaaag ctgaagtgtc tgactgacat ttacctgctc 360
 aacctggcca tctctgatct gctttttctt attactctcc cattgtgggc tcaactctgct 420
 gcaaatgagt gggctctttg gaatgcaatg tgcaaatat tcacagggct gtatcacatc 480
 ggttatcttg gcggaatctt tttcatcatc ctgctgacga ttgacaggta cctggccatc 540
 30 gtccacgccg tgtttgcctt gcgggcacgg accgtcactt ttgggtgcat caccagcatc 600
 atcatttggg ccctggccat ctgggcttcc atgccaggct tatacttttc caagacccaa 660
 tgggaattca ctaccacac ctgcagcctt cactttcttc acgaaagcct acgagagtgg 720
 aagctgtttc aggctctgaa actgaacctc tttgggctgg tattgccttt gttgggtcatg 780
 atcatctgct acacagggat tataaagatt ctgctaagac gaccaaata gaagaaatcc 840
 35 aaagctgtcc gtttgatttt tgtcatcatg atcatctttt ttctcttttg gacccccctac 900
 aatttgacta tacttatttc tgttttccaa gacttcctgt tcacccatga gtgtgagcag 960
 agcagacatt tggacctggc tgtgcaagtg acggaggtga tcgcctacac gcactgctgt 1020
 gtcaaccagc tgatctacgc ctccgttggg gagaggttcc ggaagtacct gcggcagttg 1080
 ttccacaggg gtgtggctgt gcacctgggt aaatggctcc ccttcctctc cgtggacagg 1140
 40 ctggagaggg tcagctccac atctccctcc acaggggagc atgaactctc tgctgggttc 1200

<210> 125
 <211> 374
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens

<400> 125
 Met Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser
 1 5 10 15
 50 Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys
 20 25 30
 His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu
 35 40 45
 55 Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val
 50 55 60
 Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr
 65 70 75 80
 Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro
 85 90 95
 60 Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met
 100 110
 Cys Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile
 115 120 125

ES 2 658 117 T3

Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His
 130 135 140
 Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr
 145 150 155 160
 5 Ser Val Ile Thr Trp Leu Val Ala Val Phe Ala Ser Val Pro Gly Ile
 165 170 175
 Ile Phe Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro
 180 185 190
 10 Tyr Phe Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg Asn Ile
 195 200 205
 Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly
 210 215 220
 Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg
 225 230 235 240
 15 Ala Val Arg Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp
 245 250 255
 Thr Pro Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe
 260 265 270
 20 Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln
 275 280 285
 Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile
 290 295 300
 Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Ser Leu Phe His Ile Ala Leu
 305 310 315 320
 25 Gly Cys Arg Ile Ala Pro Leu Gln Lys Pro Val Cys Gly Gly Pro Gly
 325 330 335
 Val Arg Pro Gly Lys Asn Val Lys Val Thr Thr Gln Gly Leu Leu Asp
 340 345 350
 30 Gly Arg Gly Lys Gly Lys Ser Ile Gly Arg Ala Pro Glu Ala Ser Leu
 355 360 365
 Gln Asp Lys Glu Gly Ala
 370
 35 <210> 126
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 126
 Met Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser
 1 5 10 15
 Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys
 20 25 30
 45 His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu
 35 40 45
 Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val
 50 55 60
 Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr
 65 70 75 80
 50 Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro
 85 90 95
 Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met
 100 105 110
 55 Cys Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile
 115 120 125
 Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His
 130 135 140
 60 Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr
 145 150 155 160
 Ser Val Ile Thr Trp Leu Val Ala Val Phe Ala Ser Val Pro Gly Ile
 165 170 175
 Ile Phe Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro
 180 185 190

ES 2 658 117 T3

Tyr Phe Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg Asn Ile
 195 200 205
 5 Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly
 210 215 220
 Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg
 225 230 235 240
 Ala Val Arg Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp
 245 250
 10 Thr Pro Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe
 260 265 270
 Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln
 275 280 285
 Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile
 290 295 300
 15 Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu Ser Val Phe Phe
 305 310 315 320
 Arg Lys His Ile Thr Lys Arg Phe Cys Lys Gln Cys Pro Val Phe Tyr
 325 330 335
 20 Arg Glu Thr Val Asp Gly Val Thr Ser Thr Asn Thr Pro Ser Thr Gly
 340 345 350
 Glu Gln Glu Val Ser Ala Gly Leu
 355 360

 25 <210> 127
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 127
 Met Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser
 1 5 10 15
 Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys
 20 25 30
 35 His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala
 35 40

 40 <210> 128
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 45 <400> 128
 Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys
 1 5 10

 50 <210> 129
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 55 <400> 129
 Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro Tyr Phe
 1 5 10 15
 Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg
 20 25

 60 <210> 130
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 130
 Gln Glu Phe Phe Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp

ES 2 658 117 T3

```

1      Gln
5      <210> 131
      <211> 352
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

10     <400> 131
      Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
      1      5      10      15
      Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
      20
15     Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
      35      40      45
      Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
      50
20     Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
      65      70      75
      Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
      80
      Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
      95      100      105
25     Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
      115      120      125
      Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
      130      135      140
30     Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
      145      150      155
      Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr
      165      170      175
      Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
      180      185      190
35     Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu
      195      200      205
      Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys
      210      215      220
40     Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile
      225      230      235
      Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
      245      250      255
      Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
      260      265
45     Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
      275      280      285
      His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
      290      295      300
50     Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
      305      310      315
      Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
      325      330      335
      ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
      340      345      350

55     <210> 132
      <211> 30
      <212> ADN
      <213> Homo sapiens

60     <400> 132
      cgagagggcc tttgggatcc aactgctgcc

```

ES 2 658 117 T3

<210> 133
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 133
 ggcagcagtt ggatcccaaa ggccctctcg 30
 <210> 134
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 134
 gcaaattggg atccaactcc tgcc 24
 <210> 135
 <400> 135
 20 000
 <210> 136
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 136
 gcaaattggg gcccaactgc tgcc 24
 <210> 137
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 137
 ggcagcagtt gggccccaat ttgc 24
 <210> 138
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 138
 ctcttggtgcc aggggtgtggt ctccga 26
 <210> 139
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 139
 gatcgaagct ttcagaacc agcagagagt tcatg 35
 <210> 140
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 140
 60 gactatactt atttctgttt tcattgtcat tctcctgaac acc 43
 <210> 141
 <211> 29

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 141
 5 cgccaagcctt cattataaac cagccgaga 29

 <210> 142
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 142
 acgcgtcgac gaaactccaa acaccacaga g 31

 <210> 143
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 143
 20 gttcaggaga atgacaatga aaacagaaat aagtatagtc 40

 <210> 144
 <211> 39
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 144
 cattctcctg aacaccttcc aagacttctt gttcaccca 39

 <210> 145
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 145
 gcccaagcttc cagtgtgatg gatattctga 29

 <210> 146
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 146
 45 tgggtgaaca ggaagtcttg gaaggtgttc aggagaaatga 40

 <210> 147
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 147
 caggtgcagc tggaggagtc tgg 23

 <210> 148
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 148
 60 gaagagacgg tgaccattgt ccctt 25

 <210> 149

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 149
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagac 27
 <210> 150
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 150
 15 gtttgatctc caccttggtc cctc 24
 <210> 151
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 151
 ggcaagtggat ctgggacaga tttcacc 27
 <210> 152
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 152
 30 ggtgaaatct gtcccagatc cactgcc 27
 <210> 153
 <211> 88
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 153
 40 ttatgctggg cccagctctg tcccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgcagct 60
 tccaccaaag gcccatccgt cttcccc 88
 <210> 154
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 154
 tcatattctc tagatcattt acccagagac agggagagg 39
 <210> 155
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 155
 55 cagcgtggtg acagtgccct ccagcag 27
 <210> 156
 <211> 27
 <212> ADN
 60 <213> Homo sapiens
 <400> 156
 ctgctggagg gcactgtcac cacgctg 27

	<210>	157						
	<211>	12754						
	<212>	ADN						
5	<213>	Homo sapiens						
	<400>	157						
		ccccacctgt	aggtttggca	agctagctta	agtaacgcc	ttttgcaagg	catggaaaat	60
		acataactga	gaatagagaa	gttcagatca	aggttaggaa	ggggtggaca	tccaaaccgt	120
10		tcgatcgaat	tcattgcggt	aaaacgttcc	gtacctttta	tgtattgact	cttatctctt	180
		caagtctagt	tccaatcctt	cagagagaca	gcagaatatg	ggccaaacag	gatatctgtg	240
		gtaagcagtt	cctgccccgg	ctcagggcca	agaacagatg	gtccccagat	gcggtccccg	300
		gtctctctgt	cgctttatac	ccggtttgtc	ctatagacac	cattcgtcaa	ggacggggcc	360
		gagtccccgt	tcttgtctac	caggggtcta	cgccagggcg	cctcagcagt	ttctagagaa	420
15		ccatcagatg	tttccagggg	gccccaaagg	cctgaaaatg	accctgtgcc	ttatttgaac	480
		taaccaatca	gttcgtctt	ggagtcgtca	aagatctctt	ggtagtctac	aaaggtccca	540
		cggggttcct	ggactttttac	tgggacacgg	aataaacttg	attggttagt	caagcgaaga	600
		cgcttctgtt	cgcgcgcttc	tgctccccga	gctcaataaa	agagcccaca	acccctcact	660
		cggcgcgcca	gtcctccgat	agactgcgtc	gccccgggtc	gccaagacaa	gcgcgcgaag	720
20		acgaggggct	cgagttatct	tctcgggtgt	tggggagtga	gccgcgcggt	caggaggcta	780
		tctgacgcag	cgggcccatg	cccccccccc	cccgtattcc	caataaagcc	tcttgcgtgt	840
		tgcatccgaa	tcgtggactc	gctgatcctt	gggaggggtc	cctcagattg	attgactgcc	900
		gggggggggg	gggcataaag	gttatctcgg	agaacgacaa	acgtaggcct	agcacctgag	960
		cgactaggaa	ccctcccaga	ggagtctaac	taactgacgg	cacctcgggg	gtctttcatt	1020
25		tggaggttcc	accgagattt	ggagaccctt	gcctagggac	caccgacccc	cccgccggga	1080
		ggtaagctgg	ccagcggctg	gtggagcccc	cagaaaagtaa	acctccaagg	tggctctaaa	1140
		cctctgggga	cggatccctg	gtggctgggg	gggcgccctt	ccattcgacc	ggtcgccagc	1200
		tttcgtgtct	gtctctgtct	ttgtgcgtgt	ttgtgcgggc	atctaattgt	tgcgccctgc	1260
		tctgtactag	ttagctaact	agctctgtat	ctggcggacc	aaagcacaga	cagagacaga	1320
30		aacacgcaca	aacacggccg	tagattacaa	acgcggacgc	agacatgatc	aatcgattga	1380
		tcgagacata	gaccgcctgg	cgtgggtggaa	ctgacgagtt	ctgaacaccc	ggccgcaacc	1440
		ctgggagacg	tcccagggac	tttggggggc	gtttttgtgg	cccgacctga	ggaagggagt	1500
		gcaccacctt	gactgtctcaa	gacttgtggg	ccggcgttgg	gaccctctgc	agggtcctct	1560
		aaacccccgg	caaaaacacc	gggctggact	ccttccctca	cgatgtggaa	tccgaccccc	1620
35		tcaggatatg	tggttcttgg	aggagacgag	aacctaaaac	agttccccgc	tccgtctgaa	1680
		ttttgctttt	cggtttggaa	gctacacctt	aggctggggc	agtcctatac	accaagacca	1740
		tcctctgctc	ttggattttg	tcaagggcgg	aggcagactt	aaaaacgaaa	gccaaacctt	1800
		ccgaagccgc	gcgctcttgc	tgctgcagcg	ctgcagcatc	gttctgtgtt	gtctctgtct	1860
		gactgtgttt	ctgtatttgt	ctgaaaatta	gggccagact	ggcttcggcg	cgcagaacag	1920
40		acgacgtcgc	gacgtcgtag	caagacacaa	cagagacaga	ctgacacaaa	gacataaaca	1980
		gacttttaat	cccggctctga	gttaccactc	ccttaagttt	gaccttaggt	cactggaaag	2040
		atgtcgcgag	gatcgcctac	aaccagtcgg	tagatgtcaa	gaagagacgt	tgggttacct	2100
		caatggtgag	ggaattcaaa	ctggaatcca	gtgacctttc	tacagctcgc	ctagcgcgag	2160
		ttggtcagcc	atctacagtt	cttctctgca	acccaatgga	tctgctctgc	agaatggcca	2220
45		acctttaacg	tcggatggcc	gcgagacggc	acctttaacc	gagacctcat	caccaggtt	2280
		aagatcaagg	tcttttcacc	agacgagacg	tcttaccggt	tggaaattgc	agcctaccgg	2340
		cgctctgccg	tggaaattgg	ctctggagta	gtgggtccaa	ttctagtctc	agaaaagtgg	2400
		tggcccgcac	ggacacccag	accaggtccc	ctacatcgtg	acctgggaag	ccttggcttt	2460
		tgacccccct	ccctgggtca	agcccccttg	acaccctaag	accgggcgta	cctgtgggtc	2520
50		tggtcagggg	gatgtagcac	tggacccttc	ggaaccgaaa	actgggggga	gggaccctgt	2580
		tcgggaaaca	tgtgggattc	ctccgcctc	ctcttctctc	atccgccccg	tctctcccc	2640
		ttgaacctcc	tcgttcgacc	ccgcctcgat	cctcccttta	tccagccctc	actccttctc	2700
		ggaggcggag	gagaaggagg	taggcggggc	agagaggggg	aacttggagg	agcaagctgg	2760
		ggcggagcta	ggagggaaat	aggctcgggag	tgaggaagag	taggcgccga	gatctctcga	2820
55		ggttaaactt	aagctaatga	cagcaaaggt	tcgtcgcaga	aagggctccc	cctgctcctg	2880
		ctgctgggtg	tgtaaaatct	atcccgggct	ctagagagct	ccaatttgaa	ttcgatacct	2940
		gtcgtttcca	agcagcgtct	ttcccagggc	ggacgaggac	gaccgaccac	acagtttaga	3000
		actcttgtgc	caggggtgtg	tctccgatta	caaagatgat	gatgatagcg	ctgaagacaa	3060
		taatagtta	cctcagttca	tccacggcat	actatcaaca	tgagaacacg	gtcccacacc	3120
60		agaggcta	gtttctacta	ctactatcgc	gactttctgt	attatacaat	ggagtcaagt	3180
		aggtgccgta	tgatagttgt	tctcattctc	tattttacacg	aagtatccaa	gagcttgatg	3240
		aaggggcac	cacacggtat	gactacgatg	atgggtgagc	ttgtcataaa	accagttgta	3300
		agagtaagag	ataaatgtgc	ttcataggtt	ctcgaactac	ttccccgggtg	gtgtggcata	3360

	ctgatgctac	taccactcgg	aacagtat	ttggtcacact	agcaaattgg	agcttggatc	3420
	ctgccctccg	tctactcgc	gggtgttcac	tttggttttg	tgggcaacat	gctggtcg	3480
	ctcatcctaa	taaactgcaa	tcgtttaacc	tcgaacctag	gacggaggcg	agatgagcga	3540
5	ccacaagtag	aaaccaaaac	acccgttgta	cgaccagcag	gagtagaatt	atgtgacggt	3600
	aaagctgaag	tgcttgactg	acatttacct	gctcaacctg	gccatctctg	atctgctttt	3660
	tcttattact	ctcccattgt	gggctcactc	tgctgcaaat	tttcgacttc	acgaactgac	3720
	tgtaaatgga	cgagtgggac	cggtagagac	tagacgaaaa	agaataatga	gagggtaaca	3780
	cccagtgtag	acgacgttta	gagtgggtct	ttgggaatgc	aatgtgcaa	ttattcacag	3840
	ggctgtatca	catcggttat	tttggcggaa	tcttcttcac	catcctcctg	acaatcgata	3900
10	ctcaccaga	aacccttacg	ttacacgttt	aataagtgtc	ccgacatagt	gtagccaata	3960
	aaaccgcctt	agaagaagta	gtaggaggac	tgtagctat	gatacctggc	tattgtccat	4020
	gctgtgtttg	ctttaaaagc	caggacgggc	acctttgggg	tggtgacaag	tgatgacc	4080
	tggttggtgg	ctgtgtttgc	ctatggaccg	ataacaggta	cgacacaaac	gaaatthtcg	4140
	gtcctgcccag	tggaaacccc	accactgttc	acactagtgg	accaaccacc	gacacaaacg	4200
15	ttctgtccca	ggaatcatct	ttactaaatg	ccagaaagaa	gattctgttt	atgtctgtgg	4260
	cccttatttt	ccacgaggat	ggaataat	ccacacaata	aagacagggt	ccttagtaga	4320
	aatgatttac	ggcttttctt	ctaagacaaa	tacagacacc	gggaataaaa	ggtgctccta	4380
	ccttattaaa	ggtgtgttat	atgaggaaca	ttttggggct	ggtcctgccc	ctgctcatca	4440
	tggtcatctg	ctactcggga	atcctgaaaa	ccctgtctcg	gtgtcgaaac	gagaagaaga	4500
20	tactccttgt	aaaaccccga	ccaggacggc	gacgagtagt	accagtagac	gatgagccct	4560
	taggactttt	gggacgaagc	cacagctttg	ctcttcttct	ggcatagggc	agtgagagtc	4620
	atcttcacca	tcatgattgt	ttactttctc	ttctggactc	cctataatat	tgctattctc	4680
	ctgaacacct	tccaggaatt	ccgtatcccc	tcactctcag	tagaagtggg	agtactaaca	4740
	aatgaaagag	aagacctgag	ggatattata	acagtaagag	gacttgtgga	aggtccttaa	4800
25	cttcggcctg	agtaactgtg	aaagcaccag	tcaactggac	caagccacgc	aggtgacaga	4860
	gactcctggg	atgactcatg	gctgcatcaa	tcccacatc	gaagccggac	tcattgacac	4920
	ttctgtggtc	agttgacctg	gttcgggtgcg	tccactgtct	ctgagaacct	tactgagtga	4980
	cgacgtagtt	agggtagtag	tatgccttcg	ttggggagaa	gttcagaagg	tatctctcgg	5040
	tgttcttccg	aaagcacatc	accaagcgct	cttgcaaa	atgtccagtt	ttctacaggg	5100
30	atacggaagc	aaacccctct	caagtcttcc	atagagagcc	acaagaaggc	ttctgttag	5160
	tggttcgca	agacgtttgt	tacaggtcaa	aagatgtccc	agacagtgga	tggagtact	5220
	tcaacaaaca	cgcttccac	tggggagcag	gaagtctcgg	ctggtttata	atgactcgag	5280
	ctctctagag	ggcccgtttg	tctgtcacct	acctcactga	agttgtttgt	gcggaagggt	5340
	acccctcgtc	cttcagagcc	gaccaaata	tactgagctc	gagagatctc	ccgggcaaac	5400
35	acctgcagcc	aagcttatcg	ataaaaataa	agattttatt	tagtctccag	aaaaagggg	5460
	gaatgaaaga	ccccacctgt	aggtttggca	agctagctta	tggacgtcgg	ttcgaatagc	5520
	tattttattt	tctaaaataa	atcagaggtc	tttttcccc	cttactttct	gggggtggaca	5580
	tccaaaccgt	tcatcgaat	agtaacgcca	ttttgcaagg	catggaaaat	acataactga	5640
	gaatagagaa	gttcagatca	aggttagga	cagagagaca	gcagaatatg	ggccaaacag	5700
40	tcattgctgt	aaaacgtttc	gtacctttta	tgtattgact	cttatctctt	caagtctagt	5760
	tccaatcctt	gtctctctgt	cgtcttatac	ccggtttgtc	gatattctgtg	gtaagcagtt	5820
	cctgccccgg	ctcagggcca	agaacagatg	gtccccagat	gcggtcccgc	cctcagcagt	5880
	ttctagagaa	ccatcagatg	ctatagacac	cattcgtcaa	ggacggggcc	gagtcaccgt	5940
	tcttgtctac	caggggtcta	cgccagggcg	ggagtctgca	aagatctctt	ggtagtctac	6000
45	ttccaggggt	gccccagga	cctgaaaaatg	accctgtgcc	ttatttgaac	taaccaatca	6060
	gttcgttctt	cgcttctggt	cgcgcgcttc	tgctccccga	aaaggtccca	cggggttctt	6120
	ggacttttac	tgggacacgg	aataaaacttg	attggttagc	caagcgaaga	gcgaagacaa	6180
	gcgcgcaag	acgaggggct	gctcaataaa	agagcccaca	acccctcact	cggcgcgcca	6240
	gtcctccgat	agactgcgct	gcccgggtac	ccgtgtatcc	aataaacctt	cttgagttg	6300
50	cgagttattt	tctcgggtgt	tggggagtga	gcccgcgggt	caggaggcta	tctgacgcag	6360
	cgggcccatg	ggcacatagg	ttatttggga	gaacgtcaac	catccgactt	gtggtctcgc	6420
	tgttccttgg	gaggggtctc	tctgagtgat	tgactaccg	tcagcggggg	tctttcatgg	6480
	gtaacagttt	cttgaagttg	gtaggctgaa	caccagagcg	acaaggaacc	ctcccagagg	6540
	agactacta	actgatgggc	agtcgcccc	agaaagtacc	cattgtcaa	gaacttcaac	6600
55	gagaacaaca	ttctgaggg	aggagtcgaa	tattaagtaa	tcctgactca	attagccact	6660
	gtttgaaatc	cacatactcc	aatactcctg	aaatagttca	ctctgtgtgt	aagactccca	6720
	tcctcagctt	ataattcatt	aggactgagt	taatcgggtga	caaaacttag	gtgtatgagg	6780
	ttatgaggac	tttatcaagt	ttatggacag	cgcagaaaga	gctggggaga	attgtgaaat	6840
	tgttatccgc	tcacaattcc	acacaacata	cgagccggaa	gcataaagtg	taaagcctgg	6900
60	aataacctgtc	gcgcttttct	cgacccctct	taacacttta	acaataggcg	agtgttaagg	6960
	tggtgtgtat	gctcggcctt	cgtatttcac	atcttcggacc	ggtgccta	gagtgaacta	7020
	actcacatta	attgcgttgc	gctcactgcc	cgctttccag	tcgggaaacc	tgctgtgcca	7080
	gctgcattaa	tgaatcggcc	ccacggatta	ctcactcgat	tgagtgta	taacgcaacg	7140

	cgagtgacgg	gcgaaaggct	agccctttgg	acagcacggt	cgacgtaatt	acttagccgg	7200
	aacgcgcggg	gagaggcggt	ttgcgtattg	ggcgctcttc	cgcttcctcg	ctcactgact	7260
	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	ctgcggcgag	cggtatcagc	ttgcgcgccc	ctctccgcca	7320
	aacgcataac	ccgcgagaag	gcgaaggagc	gagtgactga	gcgacgcgag	ccagcaagcc	7380
5	gacgccgctc	gccatagtcg	tactcaaaag	gcggtaatat	ggttatccac	agaatcaggg	7440
	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	7500
	agtgagtttc	cgccattatg	ccaataggtg	tcttagtccc	ctattgcgct	ctttcttgta	7560
	cactcgtttt	ccggtcgttt	tccggtcctt	ggcatttttc	gccgcgttgc	tggcgttttt	7620
	ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	agaggtggcg	7680
10	aaacccgaca	ggactataaa	cgggcgcaacg	accgcaaaaa	ggtatccgag	gcggggggac	7740
	tgctcgtagt	gttttttagct	gcgagttcag	tctccaccgc	tttgggctgt	cctgatattt	7800
	gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	tcgctgcgct	tctgttccg	accctgccgc	7860
	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctcccct	cggaagcgt	ctatggtccg	caaaggggga	7920
	ccttcgaggg	agcacgcgag	aggacaaggc	tgggacggcg	aatggcctat	ggacagggcg	7980
15	aaagagggaa	gcccttcgca	ggcgctttct	catagctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	8040
	gtgtaggtcg	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	cccccgttca	gccccaccgc	8100
	ccgcgaaaga	gtatcgagtg	cgacatccat	agagtcaagc	cacatccagc	aagcgagggt	8160
	cgaccgaca	cacgtgcttg	gggggcaagt	cgggctggcg	tgcgcttat	ccggtaaacta	8220
	tcgctttgag	tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	ccactggtaa	8280
20	caggattagc	agagcgaggt	acgcggaata	ggccattgat	agcagaactc	aggttgggcc	8340
	attctgtgct	gaatagcggg	gaccgtcgct	ggtgaccatt	gtcctaactc	tctcgtcca	8400
	atgtaggcgg	tgctacagag	ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagga	8460
	cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	cagttacctt	tacatccgcc	acgatgtctc	8520
	aagaacttca	ccaccggatt	gatgccgatg	tgatcttctc	gtcataaacc	atagacgcga	8580
25	gacgacttcg	gtcaatggaa	cggaaaaaga	gttggtagct	cttgatccgg	caaacaacc	8640
	accgctggta	gcggtggttt	ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	8700
	gcctttttct	caaccatcga	gaactaggcc	gtttgtttgg	tggcgaccat	cgccaccaa	8760
	aaaacaaacg	ttcgctcgct	aatgcgcgct	tttttttctc	tctcaagaag	atcctttgat	8820
	cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtggaa	cgaaaactca	cgtaaagggg	ttttggctat	8880
30	gagattatca	aaaaggatct	agagttcttc	taggaaacta	gaaaagatgc	cccagactgc	8940
	gagtcacctt	gcttttgagt	gcaattccct	aaaaccagta	ctctaatagt	ttttcctaga	9000
	tcacctagat	ccttttaaat	taaaaatgaa	gttttaaatc	aatctaaagt	atataatgagt	9060
	aaacttggtc	tgacagttac	caatgcttaa	tcagtgaggc	agtggatcta	ggaaaattta	9120
	atttttactt	caaaaatttag	ttagatttca	tatatactca	tttgaaccag	actgtcaatg	9180
35	gttacgaatt	agtcactccg	acctaactca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	9240
	ccctgactcc	ccgtcggtga	gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggccccagt	9300
	tggatagagt	cgctagacag	ataaagcaag	taggtatcaa	cggactgagg	ggcagcacat	9360
	ctattgatgc	tatgccctcc	cgaatggtag	accggggtca	gctgcaatga	taccgcgaga	9420
	cccacgctca	ccggctccag	atztatcagc	aataaacagc	ccagccggaa	gggccgagcg	9480
40	cagaagtggg	cctgcaactt	cgacggtact	atggcgctct	gggtgagcag	ggccgaggtc	9540
	taaatagtcg	ttatttggct	ggctggccct	cccggctcgc	gtcttcacca	ggacgttgaa	9600
	tatccgcctc	catccagtct	attaattggt	gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	9660
	ttaatagttt	gcgcaacggt	gttgccattg	ctacaggcat	ataggcggag	gtaggtcaga	9720
	taattaacaa	cggcccttcg	atctcattca	tcaagcggct	aattatcaaa	cgcgttgcaa	9780
45	caacggtaac	gatgtccgta	cgtggtgtca	cgctcgtctc	ttggtatggc	ttcattcagc	9840
	tccggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	tgatccccca	tgttgtgcaa	aaaagcggtt	9900
	gcaccacagt	gcgagcagca	aaccataccg	aagtaagtcg	aggccaaggg	ttgctagttc	9960
	cgctcaatgt	actagggggg	acaacacggt	ttttcgccaa	agctccttcg	gtcctccgat	10020
	cgttgtcaga	agtaagttgg	ccgcagtggt	atcactcatg	gttatggcag	cactgcataa	10080
50	ttctcttact	gtcatgccat	tcgaggaagc	caggaggcta	gcaacagtct	tcattcaacc	10140
	ggcgtcacia	tagtgagtac	caataccgct	gtgacgtatt	aagagaatga	cagtacggta	10200
	ccgtaagatg	cttttctgtg	actggtgagt	actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgta	10260
	tgccggcgacc	gagttgctct	tgcccggcgt	caatacggga	ggcattctac	gaaaagacac	10320
	tgaccactca	tgagtgggtt	cagtaagact	cttatcacat	acgccgctgg	ctcaacgaga	10380
55	acggggccgca	gttatgccct	taataaccgg	ccacatagca	gaactttaa	agtgtctatc	10440
	attgaaaaac	gttcttcggg	gcgaaaaactc	tcaaggatct	taccgctggt	gagatccagt	10500
	attatggcgc	ggtgtatcgt	cttgaaaattt	tcacgagtag	taaccttttg	caagaagccc	10560
	cgcttttgag	agttcctaga	atggcgacaa	ctctaggtca	tcgatgtaac	ccactcgtgc	10620
	acccaactga	tcttcagcat	cttttacttt	caccagcgtt	tctgggtgag	caaaaacagg	10680
60	aaggcaaaat	gcccgaaaaa	agctacattc	ggtgagcagc	tgggttgact	agaagtcgta	10740
	gaaaaatgaa	gtggctcгаа	agaccacttc	gtttttgtcc	ttccgttttt	cgccgttttt	10800
	agggaaataag	gctgcacacgg	aaatggtgaa	tactcatact	cttccttttt	caaatatttt	10860
	gaagcattta	tcagggttat	tgtctcatga	gcggatacat	tcccttattc	ccgctgtgcc	10920

```

tttacaactt atgagtatga gaaggaaaaa gttataataa cttcgtaaat agtcccaata 10980
acagagtact cgcctatgta atttgaatgt atttagaaaa ataaacaat aggggttccg 11040
cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta 11100
taaacttaca taaatctttt tatttgttta tccccaaaggc gcgtgtaaag gggcttttca 11160
5 cggtggactg cagattcttt ggtaataata gtactgtaat acctataaaa ataggcgtat 11220
cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca 11280
gctcccggag acggtcacag tggatatttt tatccgcata gtgctccggg aaagcagagc 11340
cgcgaaaagg actactgcca cttttggaga ctgtgtacgt cgagggcctc tgccagtgtc 11400
cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtgttg 11460
10 gcgggtgctg aggctggcct aactatgcgg catcagagca gaacagacat tcgcctacgg 11520
ccctcgtctg ttcgggcagt cccgcgcagt cgccacaac cgcccacagc cccgaccgaa 11580
ttgatacgcc gtagtctcgt gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaataccg 11640
cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac aggcgcatt cgccattcag gctgcgcaac 11700
ctaactgac tctcacgtgg tatacgccac actttatggc gtgtctacgc attcctcttt 11760
15 tatggcgtag tccgcggtaa gcggtaagtc cgacgcgttg tgttgggaag ggcgatcgg 11820
gcgggctctc tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag 11880
ttgggtaacg ccagggtttt acaacccttc ccgctagcca cgcccggaga agcgataatg 11940
cggtcgaccg ctttccccct acacgacggt ccgctaattc aaccattgc ggtcccaaaa 12000
cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgc 12060
20 caacagtccc ccggccacgg ggctgcccac catacccagc gggtcagtgc tgcaacattt 12120
tgctgccgcy ttccttacca cgtacgttcc tctaccgcyg gttgtcaggg ggccggtgcc 12180
ccggacggtg gtatgggtgc ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg cgagcccgat 12240
cttccccatc ggtgatgctg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg gcgccggtga 12300
ggctttgttc gcgagtactc gggcttcacc gctcgggcta gaaggggtag ccactacagc 12360
25 cgctatatcc gcggtcgttg gcgtggacac cgcggccact tgccggccac gatgcgtccg 12420
gcgtagaggc gattagtcca atttgttaaa gacaggatat cagtggcca ggctctagtt 12480
ttgactcaac aatatcacca acggccgggtg ctacgcaggc cgcatctccg ctaatcaggt 12540
taaacaattt ctgtcctata gtcaccaggt ccgagatcaa aactgagttg ttatagtggt 12600
gctgaagcct atagagtacg agccatagat aaaataaaaag attttattta gtctccagaa 12660
30 aaagggggga tgaaagacga cttcggatat ctcatgctcg gtatctattt tttttctaa 12720
aataaatcag aggtcttttt cccccctact ttct 12754

```

```

<210> 158
<211> 119
35 <212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 158
40 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
50 85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

```

```

55 <210> 159
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

60 <400> 159
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

```

ES 2 658 117 T3

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 5 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ser Gly Val Pro
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 10 Thr His Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 110
 <210> 160
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 160
 20 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
 25 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 80 Ala Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 110
 35 Met Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 161
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 161
 45 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 50 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu
 80 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 162
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 658 117 T3

<400> 162
 1 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 5 Ser Leu Arg Leu 5 Ser Cys Ala Ala Ser 10 Gly Phe Thr Phe Ser 15 Tyr Gly
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 10 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp 90 Ile Trp Gly Gln Gly 95 Thr Met
 15 Val Thr Val Ser Ser 105 110 115

<210> 163
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 163
 25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 30 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr
 85 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 90 95 100 105

<210> 164
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 164
 45 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 50 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 55 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 Ala Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110 115
 60 Met Val Thr Val Ser Ser 115

<210> 165

ES 2 658 117 T3

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 165
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 10 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 15 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 20 Lys

<210> 166
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 166
 30 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tacattgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg atcaatccta gtggtggtcg cacaagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt tttactgtgc gagagagaga 300
 tgggtataagt ggaacttcga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
 35 tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgct tccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
 tccgagagca cagccgacct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ctttcccggc tgtcctacag 540
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600
 aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660
 40 gagtccaaat atggtcccc atgccccatca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctccc gaccctgag 780
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
 45 tacaagtgca aggtctcaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020
 gccaaaaggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 50 gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320
 aagagcctct ccctgtctct gggtaaataga 1350

<210> 167
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 167
 60 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tacattgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg atcaatccta gtggtggtcg cacaagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt tttactgtgc gagagagaga 300

ES 2 658 117 T3

	tggataagt ggaacttcga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc tcctca	360 366
5	<210> 168 <211> 15 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 168 agctactata tacat	15
15	<210> 169 <211> 51 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 169 atgatcaatc ctagtgggtg tcgcacaagc tacgcacaga agttccaggg c	51
25	<210> 170 <211> 39 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 170 gagagatggt ataagtggaa cttcgatgct tttgatatc	39
35	<210> 171 <211> 90 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 171 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt tcctgcaagg catctggata caccttcacc	60 90
45	<210> 172 <211> 42 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 172 tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatgg ga	42
55	<210> 173 <211> 96 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 173 agagtcacca tgaccagggga cacgtccacg agcacagtct acatggacct gagcagcctg agatctgagg acacggccgt gttttactgt gcgaga	60 96
65	<210> 174 <211> 33 <212> ADN <213> Homo sapiens	
70	<400> 174 tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc tca	33
	<210> 175 <211> 449	

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 175
 5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 10 35 45
 Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 15 Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 20 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 25 Val Ser Trp Asn Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 30 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 35 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 40 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 45 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 50 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 55 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 60 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys

ES 2 658 117 T3

```

<210> 176
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 176
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
10 20 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
15 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95
20 Ala Arg Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 177
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30
<400> 177
Ser Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 178
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35
<400> 178
Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
40 5 10 15
Gly

<210> 179
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
45
<400> 179
Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile
50 5 10

<210> 180
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
55
<400> 180
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
60 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

```

ES 2 658 117 T3

```

<210> 181
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 181
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10
10
<210> 182
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15
<400> 182
Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Asp
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys Ala Arg
20 30
20
<210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25
<400> 183
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
30
<210> 184
<211> 663
<212> ADN
<213> Homo sapiens
35
<400> 184
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccaac agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctacacgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
40 atcagcagcc agcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttacagtact 300
cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaaga acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
45 ctacagcagc ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660
tag 663
50
<210> 185
<211> 339
<212> ADN
<213> Homo sapiens
55
<400> 185
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccaac agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctacacgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc agcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttacagtact 300
60 cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339
<210> 186
<211> 51

```

ES 2 658 117 T3

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 186
 5 aagtcagcc agagtgtttt atacagctcc aacaataaga actacttagc t 51

 <210> 187
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 187
 tgggcatcta cacgggaatc c 21

 <210> 188
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 188
 20 cagcaatatt acagtactcc tcggacg 27

 <210> 189
 <211> 69
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 189
 30 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgc 69

 <210> 190
 <211> 45
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens

 <400> 190
 tggtagcaac agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttac 45

 <210> 191
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 191
 45 ggggtccctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcactct caccatcagc 60
 agccagcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgt 96

 <210> 192
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 192
 55 ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa 30

 <210> 193
 <211> 220
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

 <400> 193
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

ES 2 658 117 T3

1 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20
 5 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65
 10 Ile Ser Ser Gln Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 70
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 85
 15 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Ser Asp
 100
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 115
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 130
 20 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 145
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 165
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 180
 25 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 195
 210 215 220

30 <210> 194
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 194
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20
 40 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65
 45 Ile Ser Ser Gln Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 70
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 85
 100 105 110
 Lys

55 <210> 195
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <400> 195
 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

<210> 196

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 196
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 10 <210> 197
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 197
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
 1 5
 20 <210> 198
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 198
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20
 30 <210> 199
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 199
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 40 <210> 200
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 200
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Gln Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 50 <210> 201
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 201
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10
 60 <210> 202
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = E o D

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = Q, N, R, K o H

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = A, G, W o Y

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = W, Y, K, R o H

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X = K, R, H, W, Y, T o S

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = Y, W, N o Q

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X = A, G o V

35

<400> 202
 Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Phe Asp Ile
 1 5 10

40

<210> 203
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = D o E

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = Q o R

55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = A o W

60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = W o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X = W O K
5
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X = Y O N
10
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X = A O V
15
<400> 203
Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Phe Asp Ile
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al receptor de quimioquina C-C humano de tipo 2 (CCR2), que comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (V_H) que comprende una CDR1 de V_H tal como se expone en SEQ ID NO: 84, una CDR2 de V_H tal como se expone en SEQ ID NO: 85, y una CDR3 de V_H tal como se expone en SEQ ID NO: 86; y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera (V_L) que comprende una CDR1 de V_L tal como se expone en SEQ ID NO: 102, una CDR2 de V_L tal como se expone en SEQ ID NO: 103, y una CDR3 de V_L tal como se expone en SEQ ID NO: 104.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (V_H) seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 83 que tiene una sustitución de aminoácido conservativa, SEQ ID NO: 83 que tiene una sustitución de aminoácido de la línea germinal en comparación con SEQ ID NO: 160, y una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 83, en el que las CDR son como se definen en la reivindicación 1.
- 15 3. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera (V_L) seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 101 que tiene una sustitución de aminoácido conservativa, SEQ ID NO: 113 que tiene una sustitución de aminoácido conservativa, SEQ ID NO: 101 que tiene una sustitución de aminoácido de la línea germinal en comparación con SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 113 que tiene una sustitución de aminoácido de la línea germinal en comparación con SEQ ID NO: 161, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 101, y una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 113, en el que las CDR son como se definen en la reivindicación 1.
- 20 4. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (V_H) de SEQ ID NO: 83 y la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera (V_L) de SEQ ID NO: 113.
- 25 5. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CCR2, que comprende: CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma designado ATCC N° de Acceso PTA-6980; y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma designado ATCC N° de acceso PTA-6980.
- 30 6. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno, según la reivindicación 1, teniendo el anticuerpo la cadena pesada y la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en:
a) la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100; o
b) la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 y la cadena ligera que tiene una
40 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112.
7. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada es SEQ ID NO: 116 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera es SEQ ID NO: 112.
- 45 8. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno, según la reivindicación 1, que comprende además una o más secuencias de aminoácidos de FR1, FR2, FR3 o FR4 de V_H y/o FR1, FR2, FR3 o FR4 de V_L de una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 112.
- 50 9. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno, según la reivindicación 8, que comprende además un dominio constante de cadena pesada.
- 55 10. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno, según la reivindicación 9, que comprende además un dominio constante de cadena ligera.
11. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 12. Línea celular aislada que produce el anticuerpo monoclonal humano aislado o parte de unión a antígeno, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

13. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo monoclonal humano aislado o parte de unión a antígeno, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 5 14. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 13, en el que el vector comprende opcionalmente una secuencia de control de la expresión unida operativamente a la molécula de ácido nucleico.
15. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para uso terapéutico.
- 10 16. Uso del anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o aliviar los síntomas de un trastorno mediado por CCR2 en un sujeto en necesidad del mismo, en el que el trastorno mediado por CCR2 se selecciona del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, un trastorno alérgico, un trastorno autoinmune, un trastorno de rechazo de injerto, aterosclerosis, obesidad, infección por VIH, dolor neuropático, estenosis, restenosis, esclerosis múltiple, una afección fibrótica, degeneración macular relacionada con la edad, uveítis, infección de la córnea y cáncer.
- 15 17. Anticuerpo monoclonal humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica, según la reivindicación 11, para usar en el tratamiento, prevención o alivio de los síntomas de un trastorno mediado por CCR2, en el que el trastorno mediado por CCR2 se selecciona del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, un trastorno alérgico, un trastorno autoinmune, un trastorno de rechazo de injerto, aterosclerosis, obesidad, infección por VIH, dolor neuropático, estenosis, restenosis, esclerosis múltiple, una afección fibrótica, degeneración macular relacionada con la edad, uveítis, infección de la córnea y cáncer.
- 20 18. Uso, según la reivindicación 16, o el anticuerpo monoclonal humano aislado o parte de unión a antígeno del mismo, para usar, según la reivindicación 17, o la composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 17, en el que dicha afección fibrótica es fibrosis hepática.
- 25 19. Uso, según la reivindicación 18, o el anticuerpo monoclonal humano aislado o parte de unión a antígeno del mismo para usar, según la reivindicación 18, o la composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 18, en el que dicha fibrosis hepática es el resultado de una infección por virus de la hepatitis C (VHC), infección por virus de la hepatitis B (VHB), esteatohepatitis alcohólica (ASH) o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- 30

Figura 1

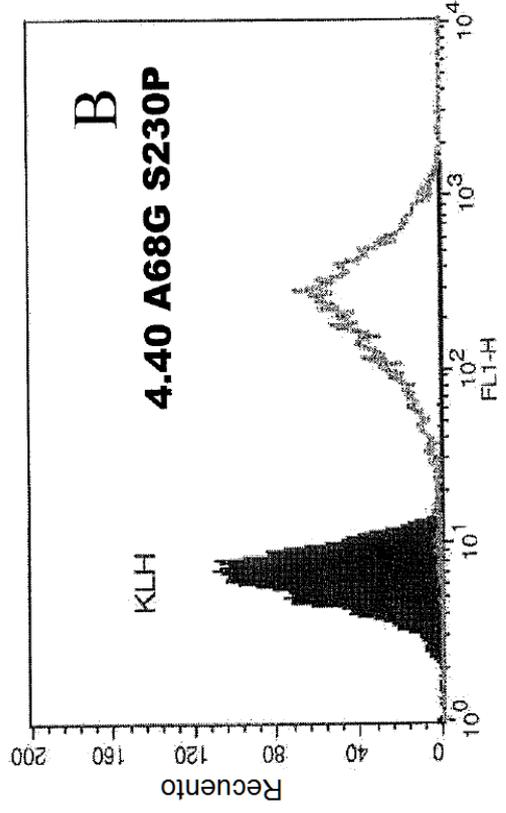
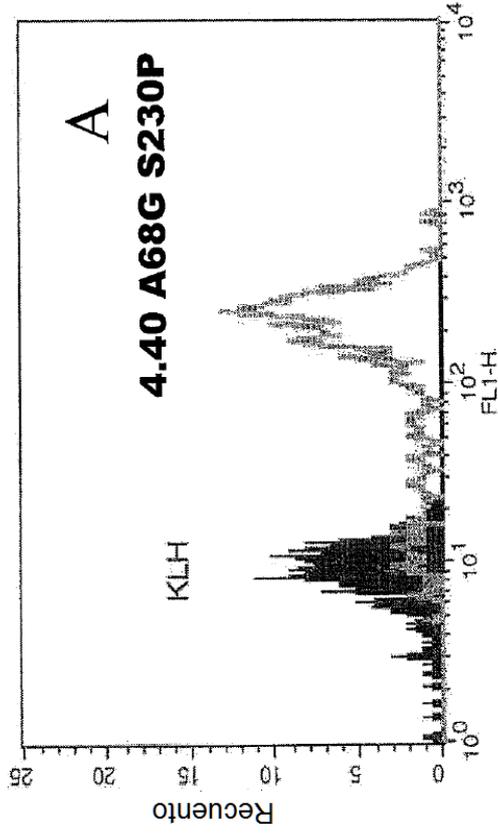


Figura 1C

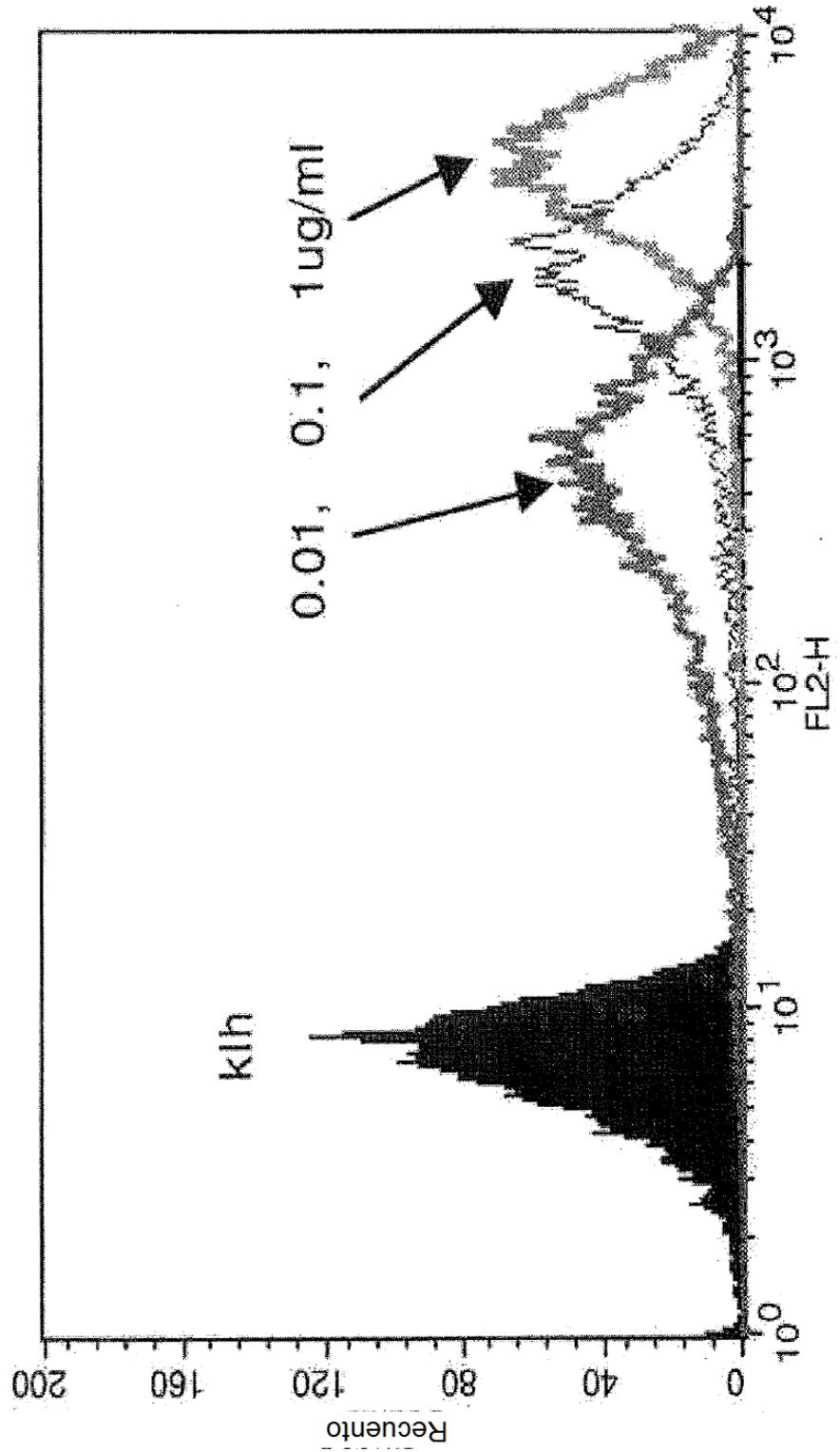


Figura 2

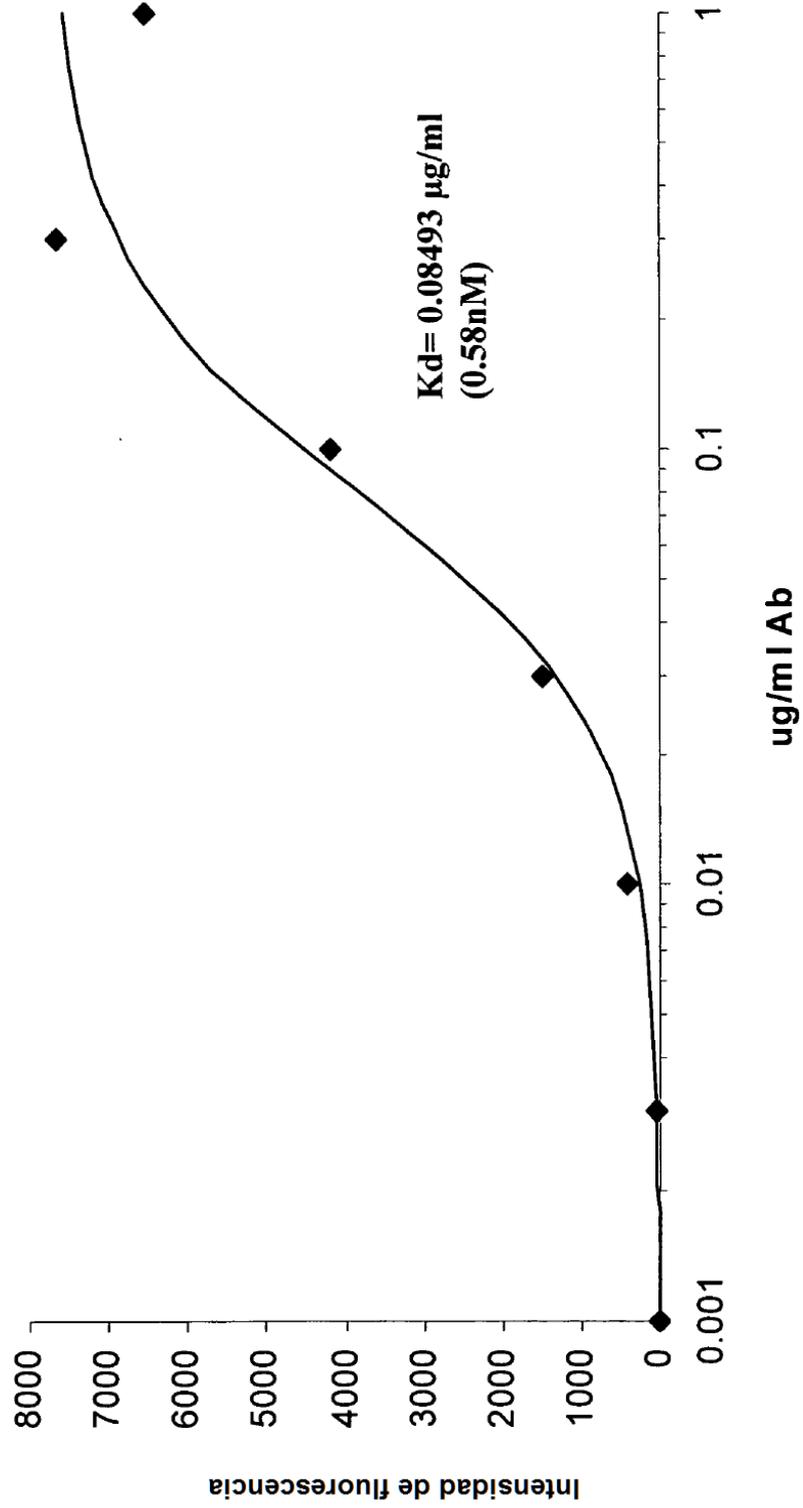


Figura 3

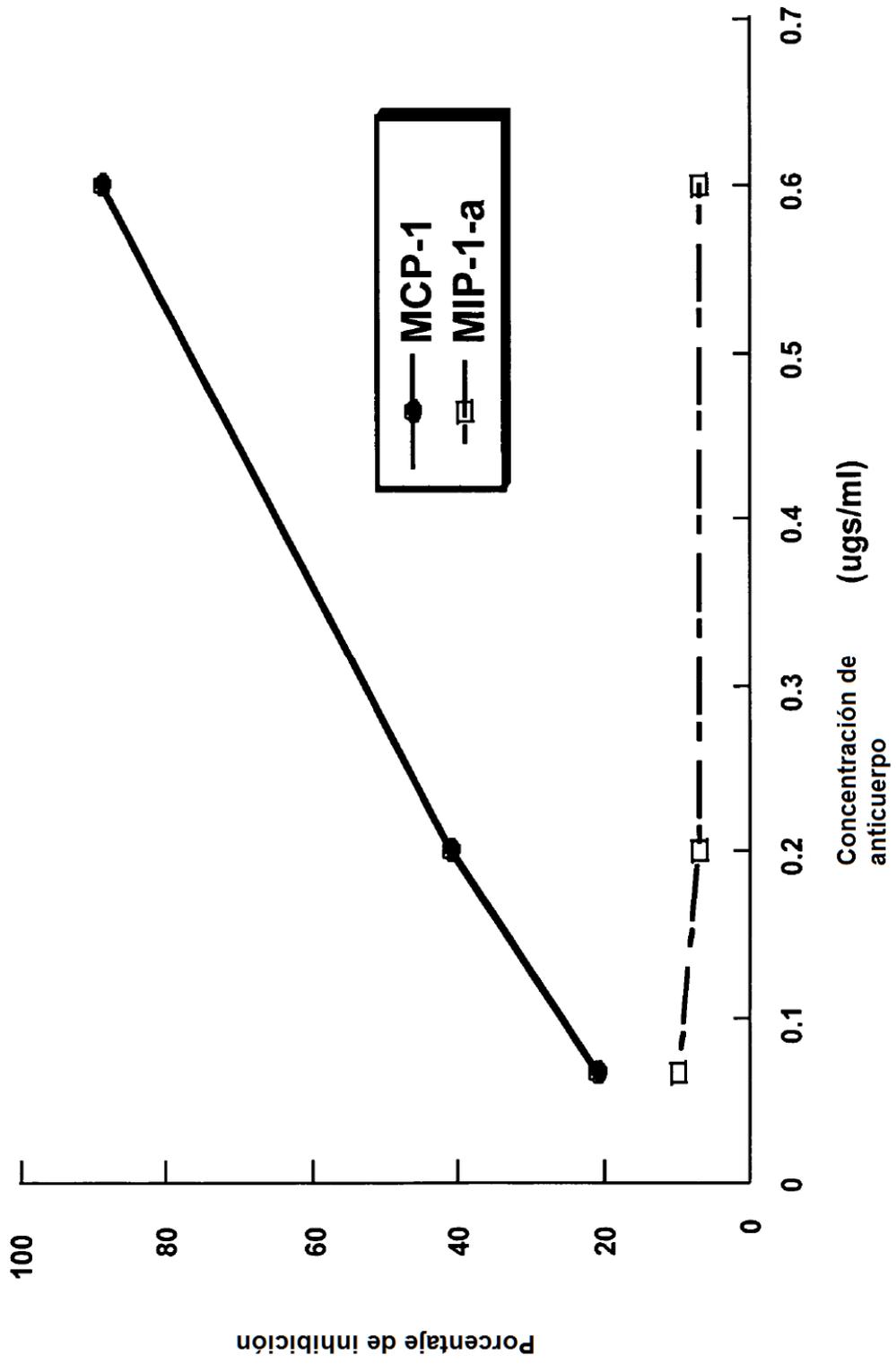
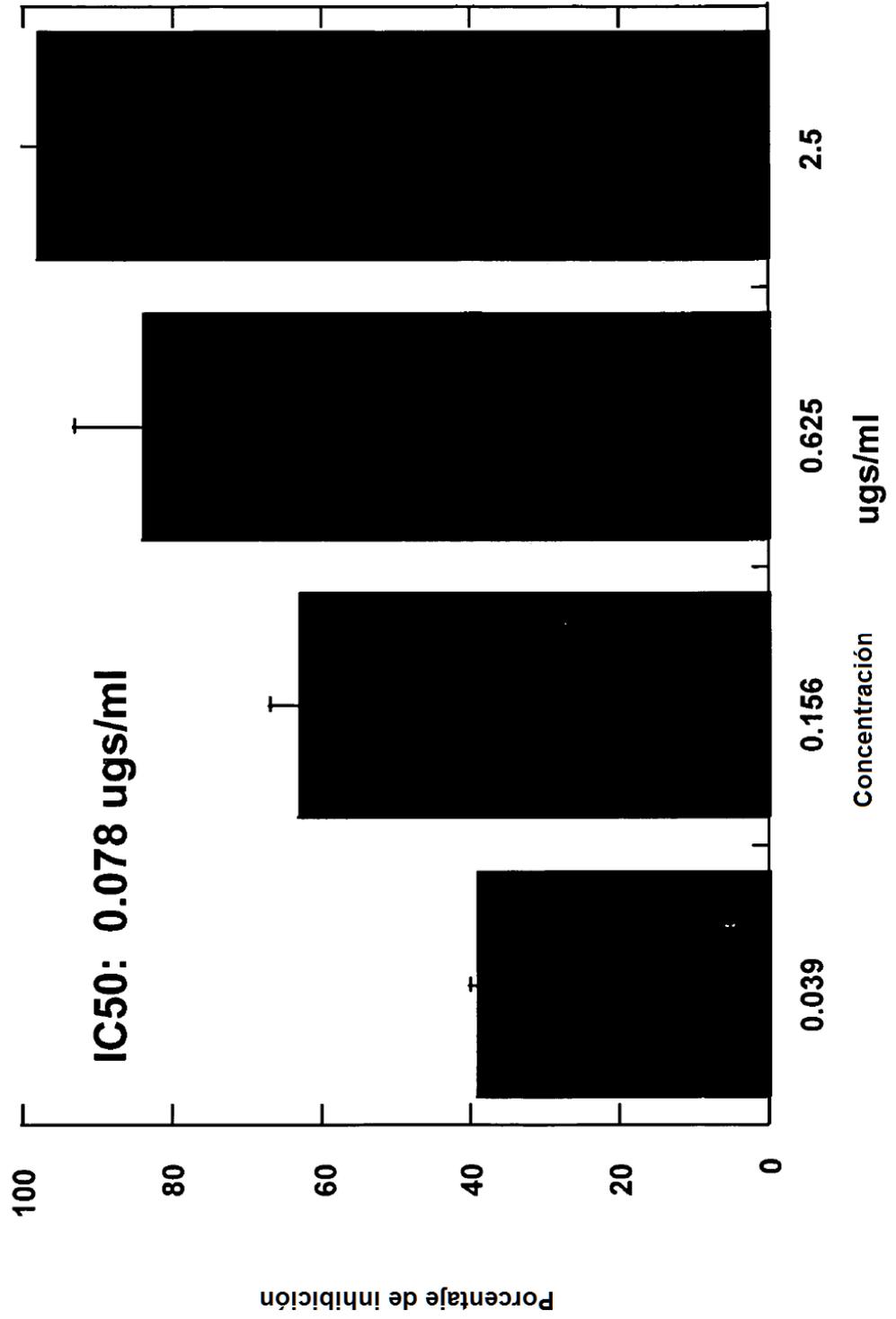


Figura 4



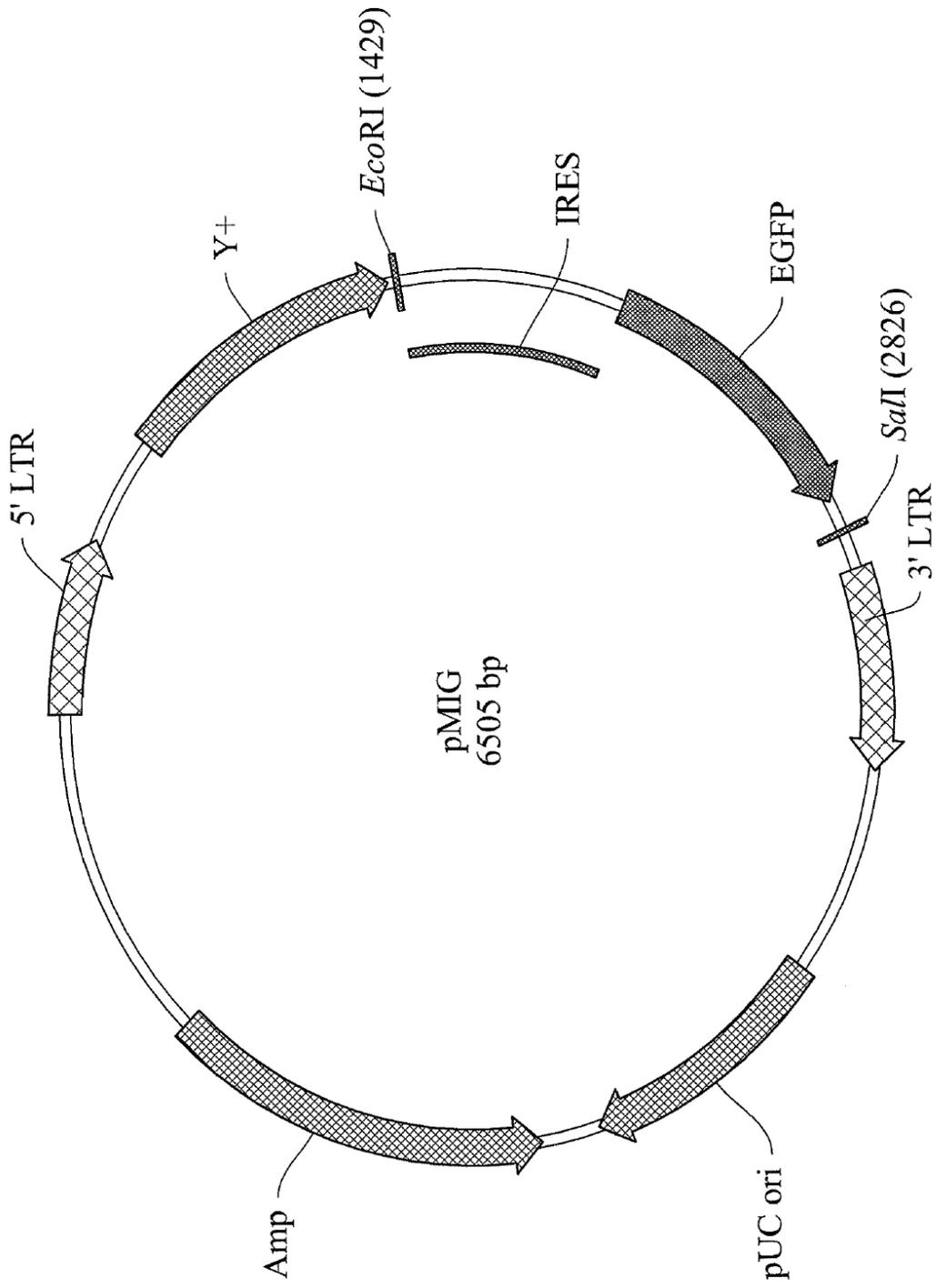


Figure 5

Figuras 6A y 6B

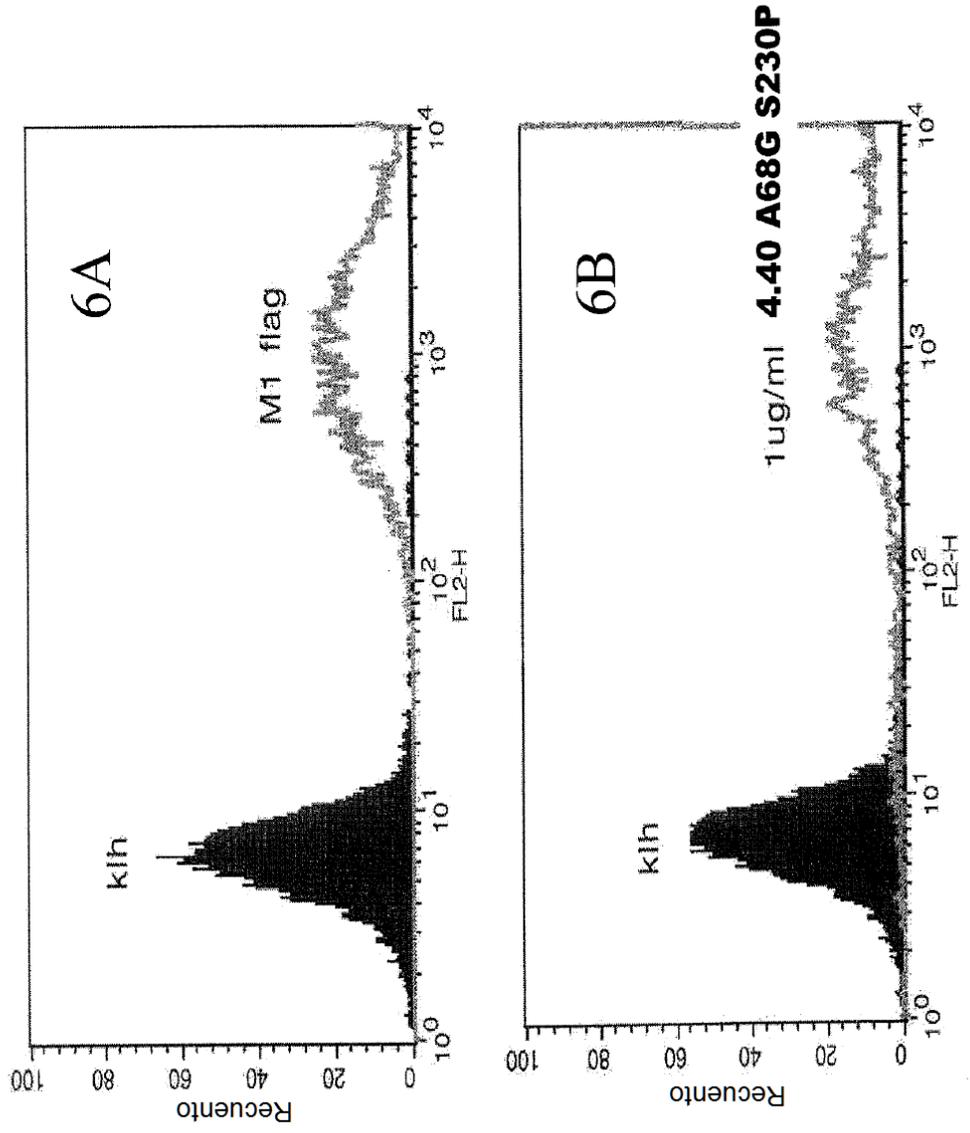


Figura 6c

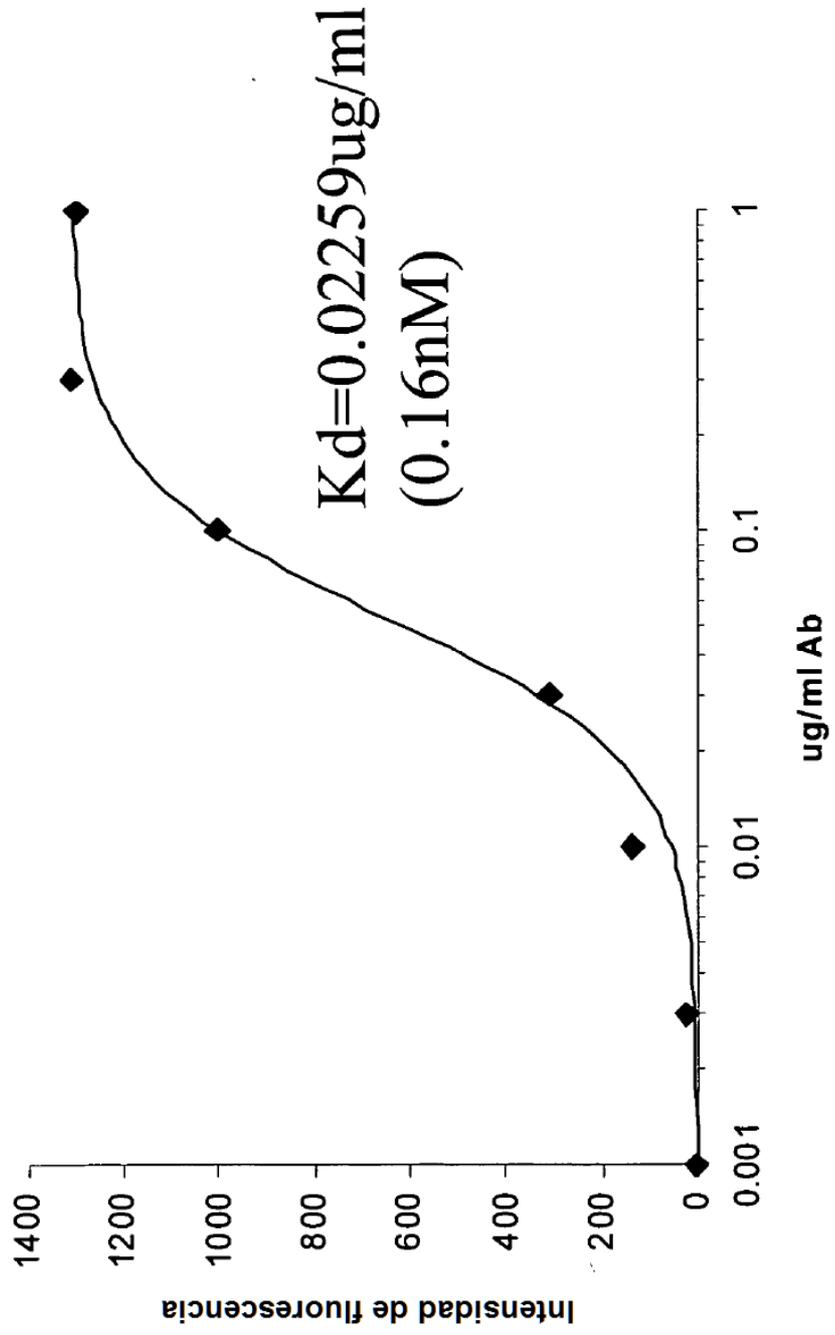


Figura 7

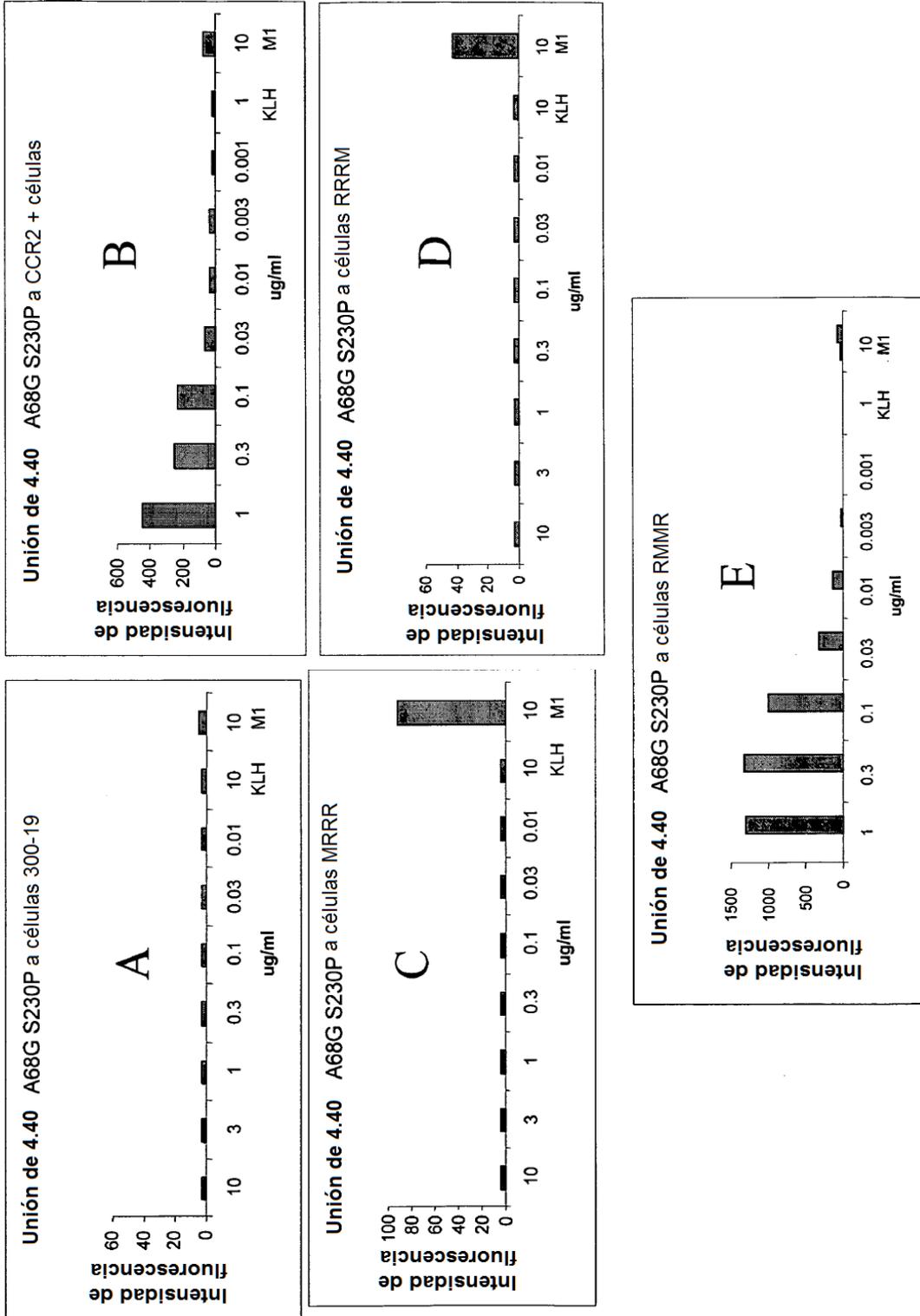
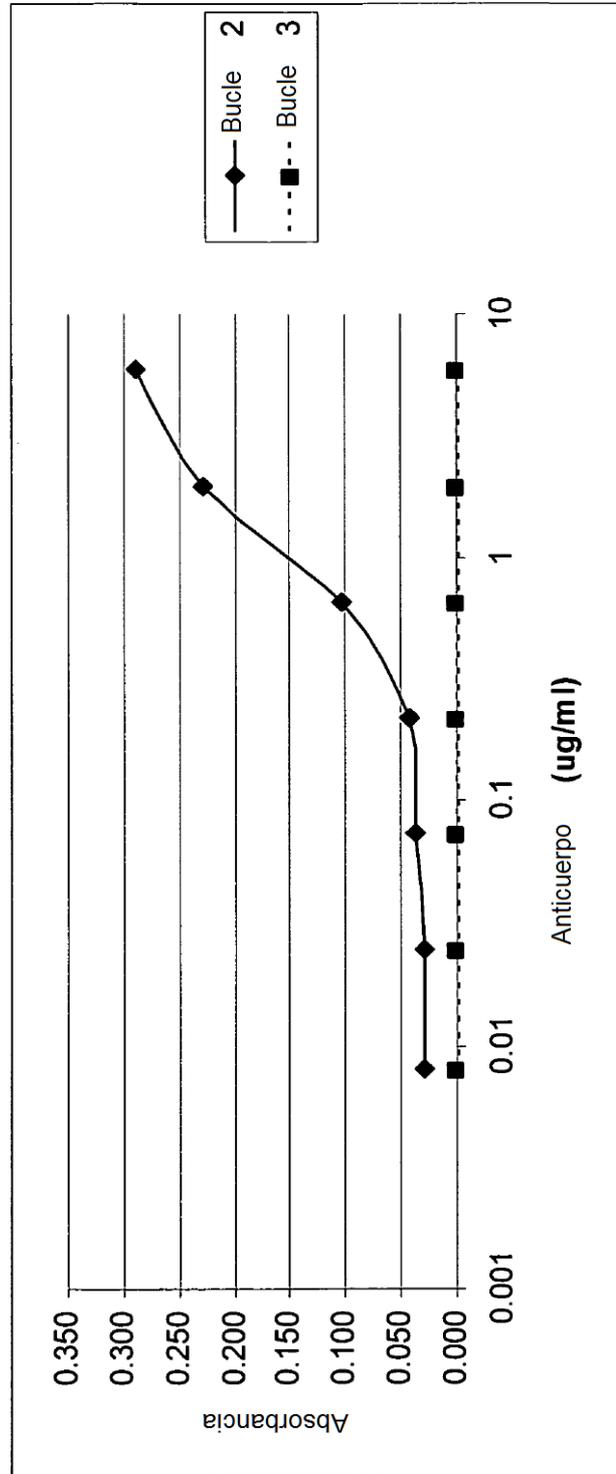


Figura 8



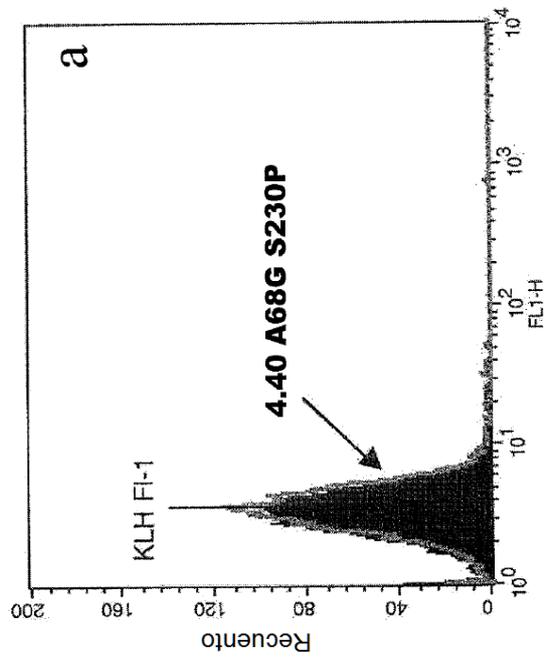
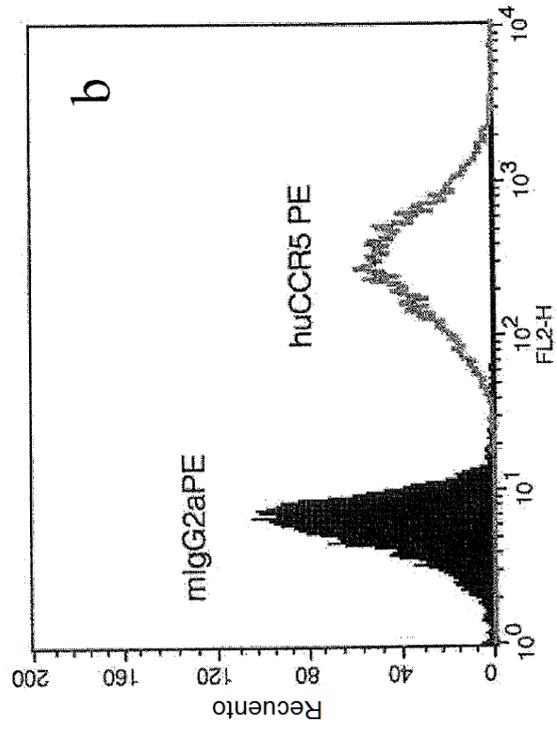


Figura 9

Figura 10

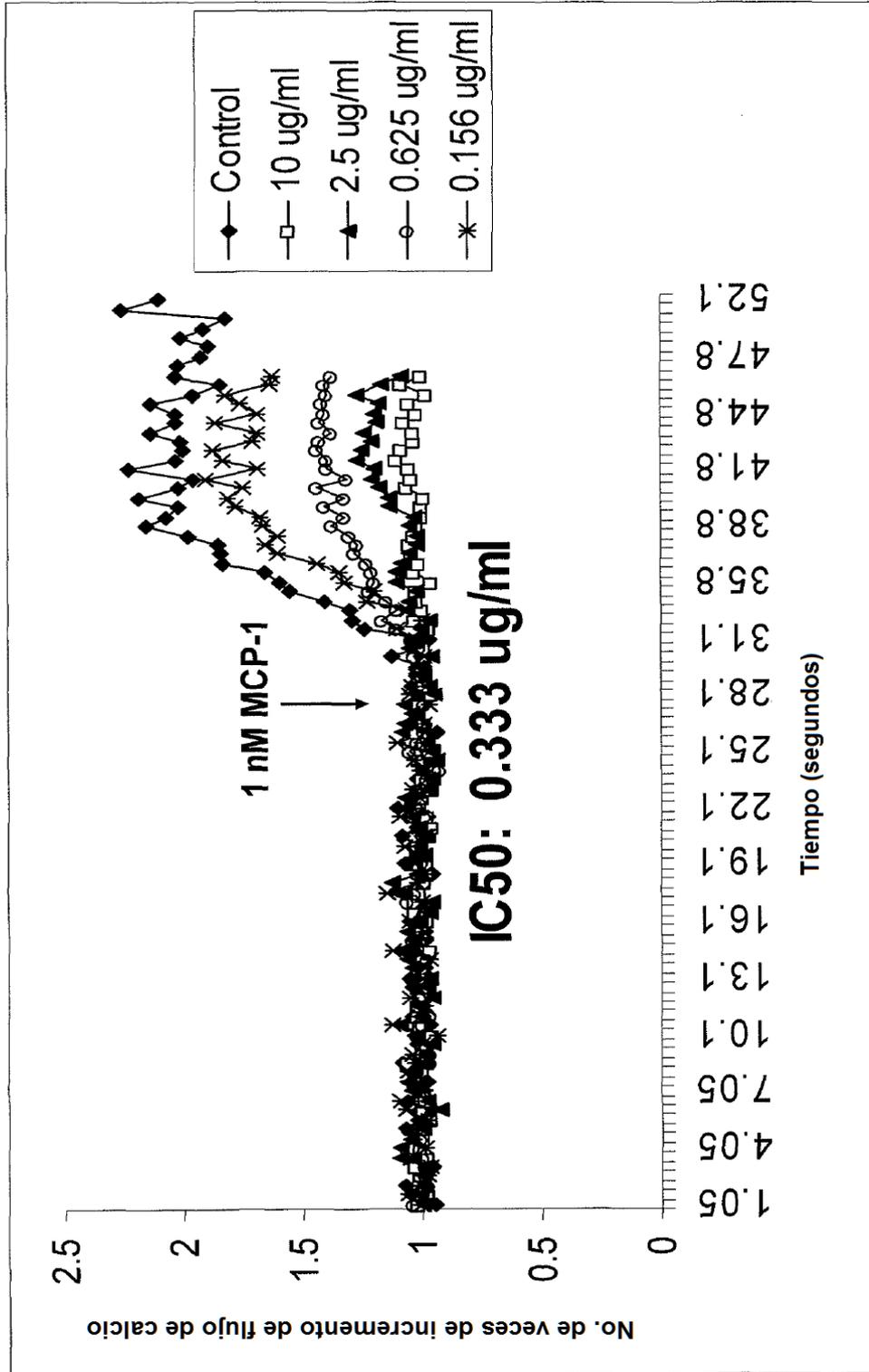


Figura 11

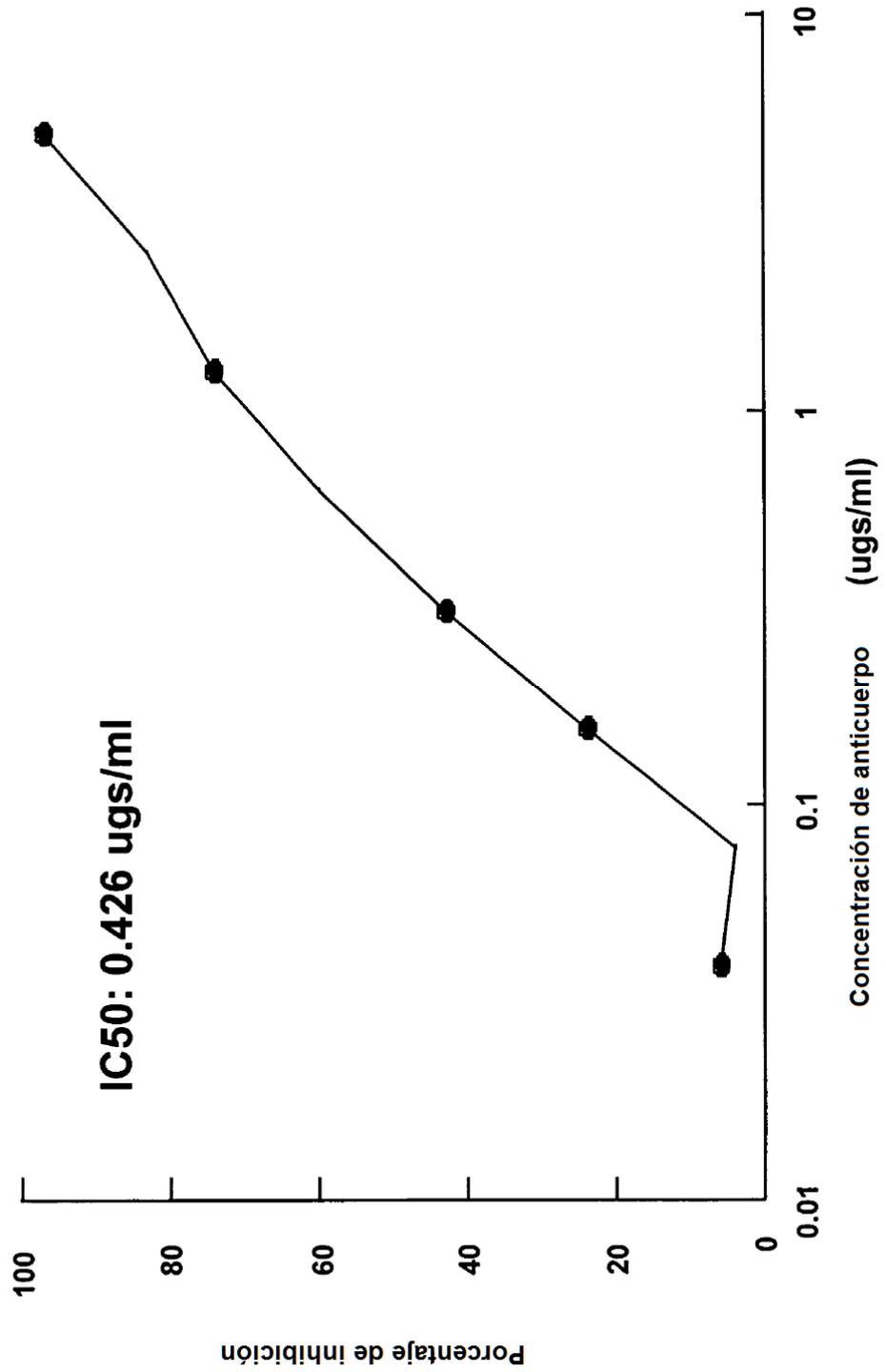


Figura 12

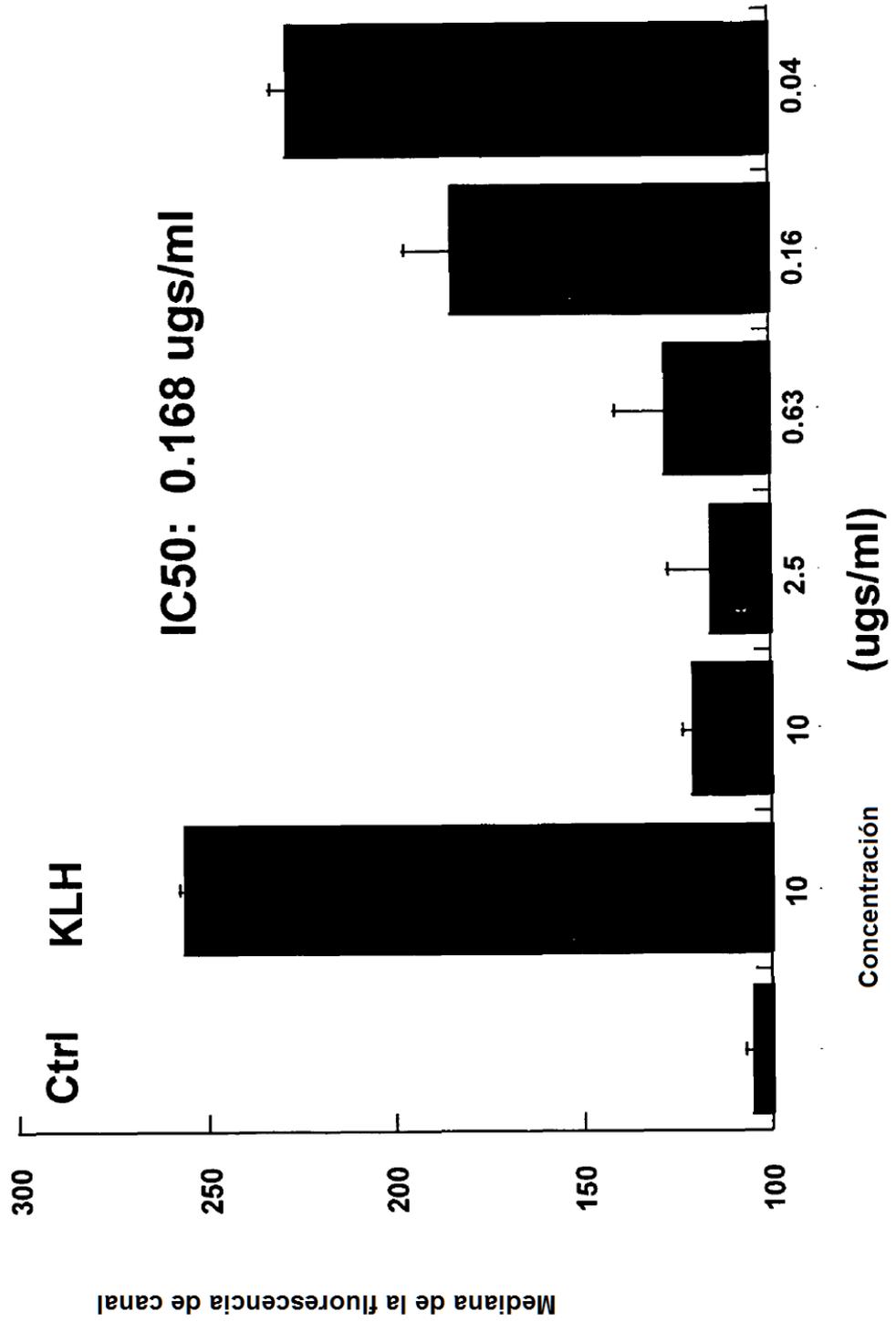


Figura 13

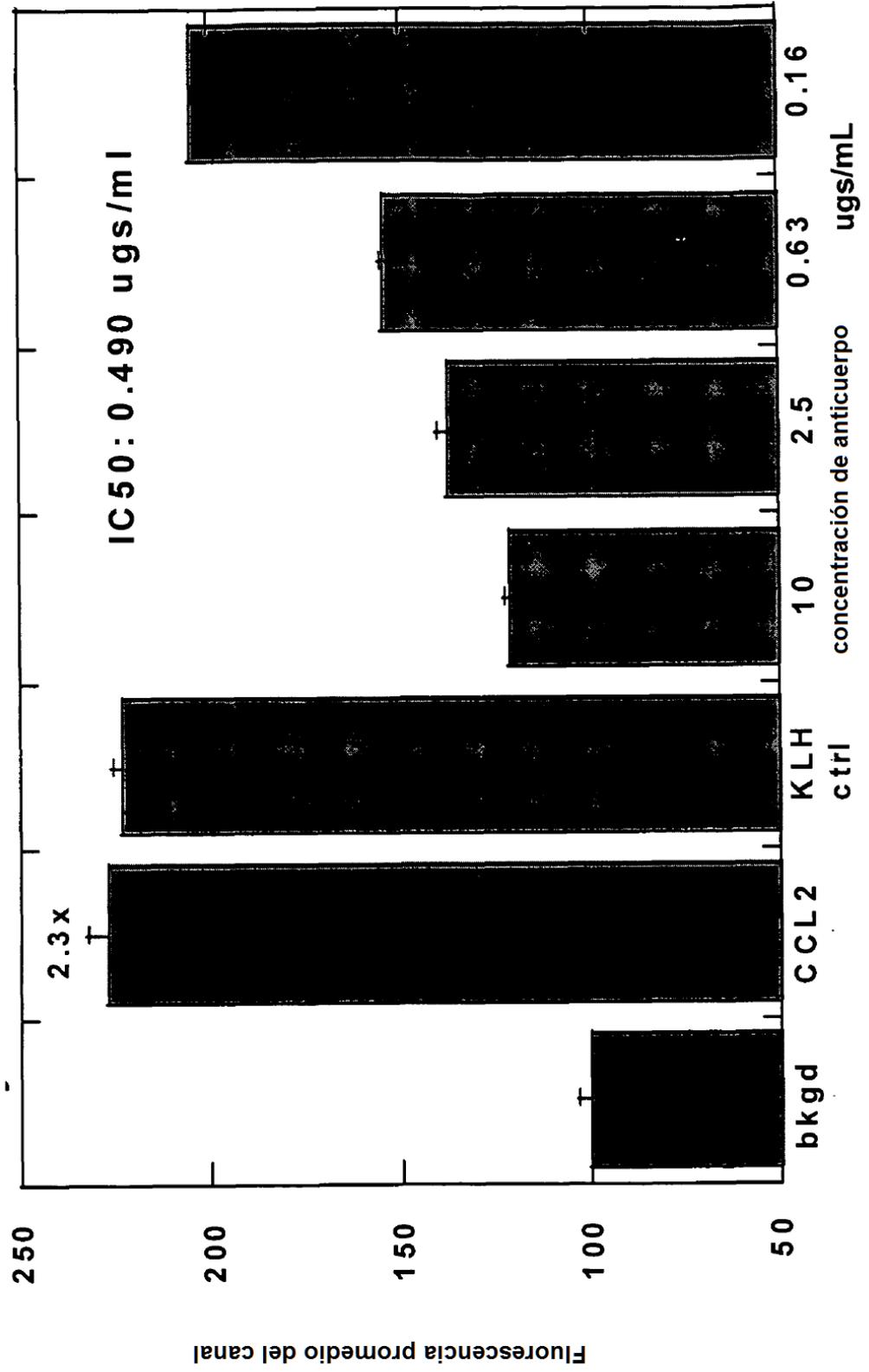


Figura 14

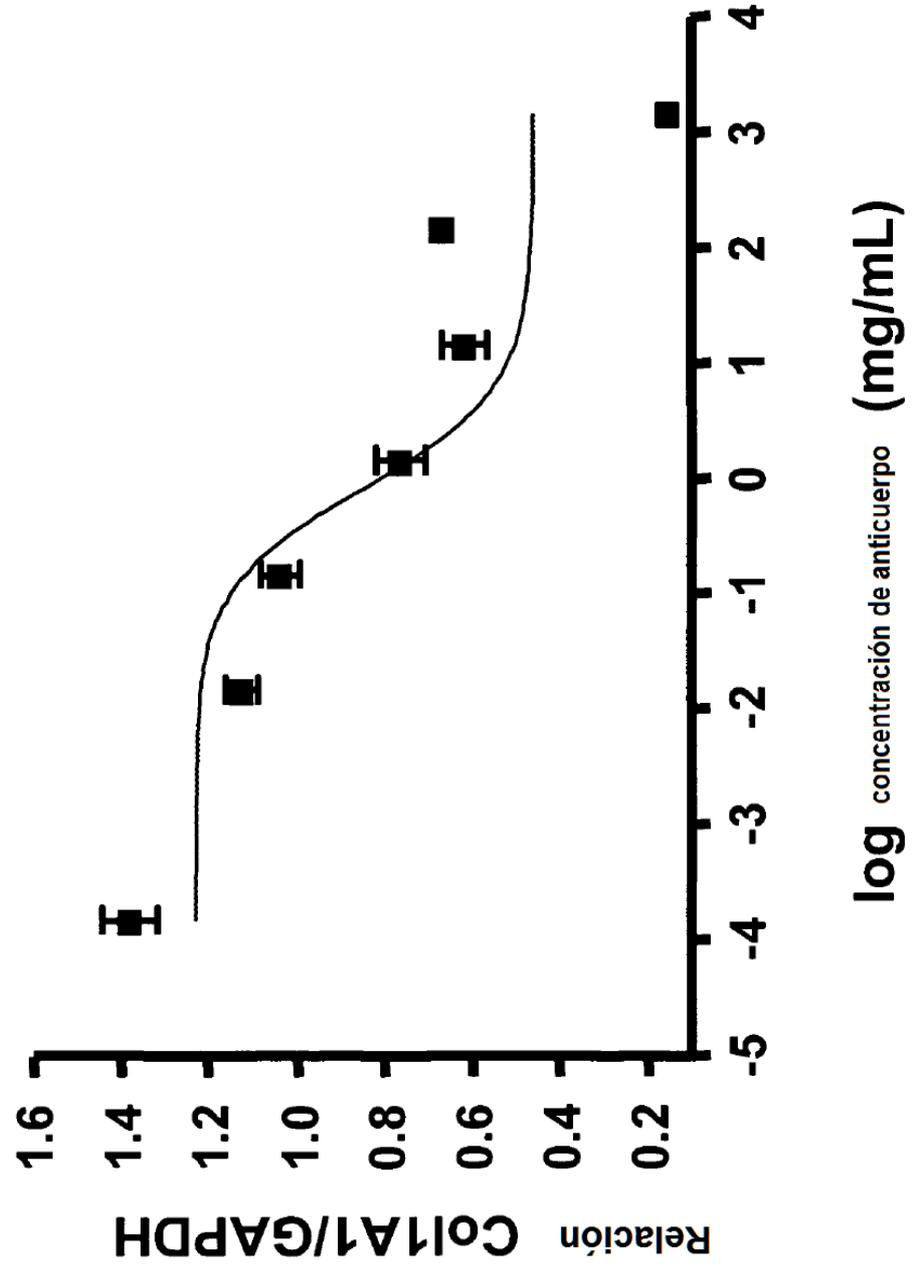


Figura 15

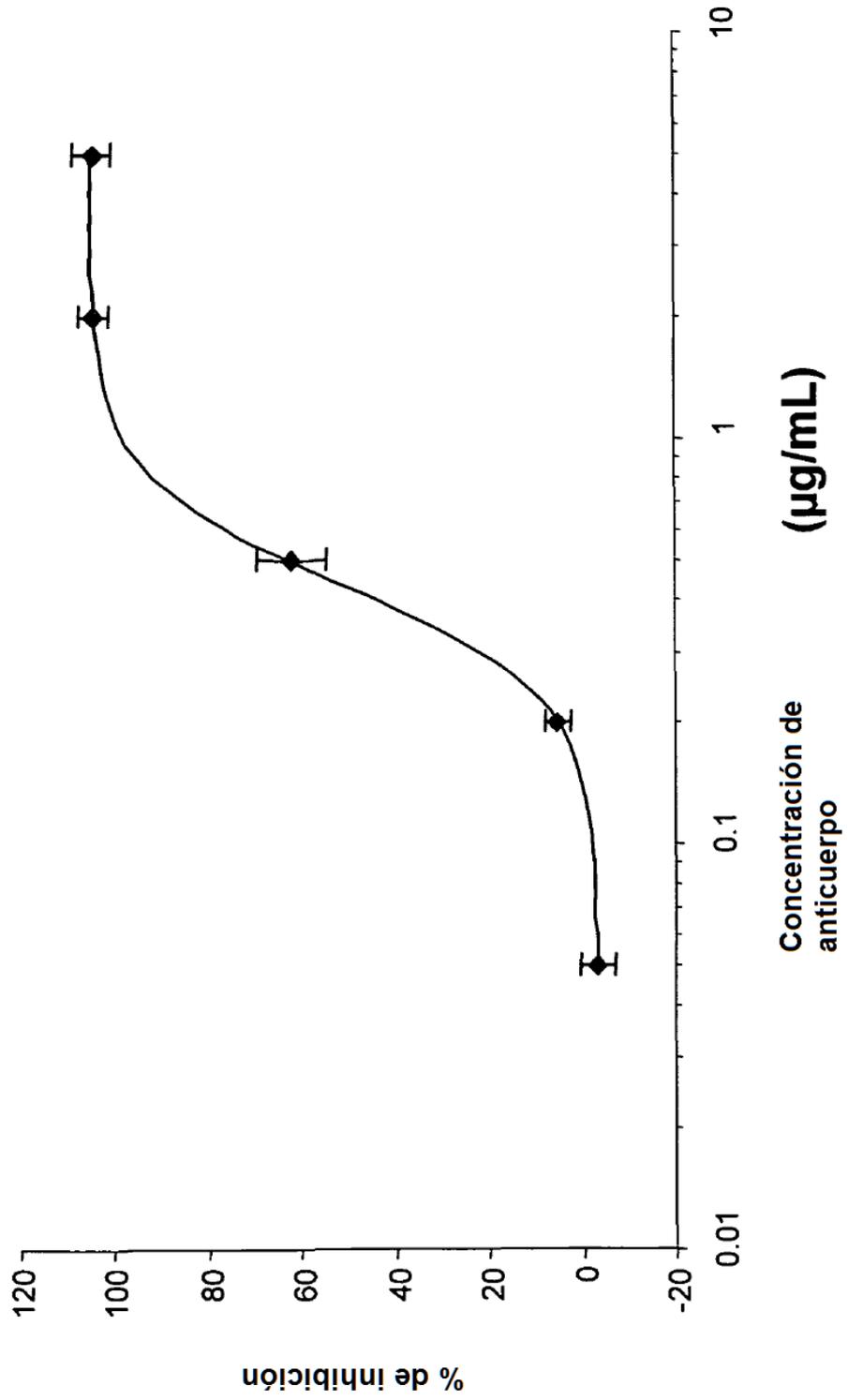


Figura 16

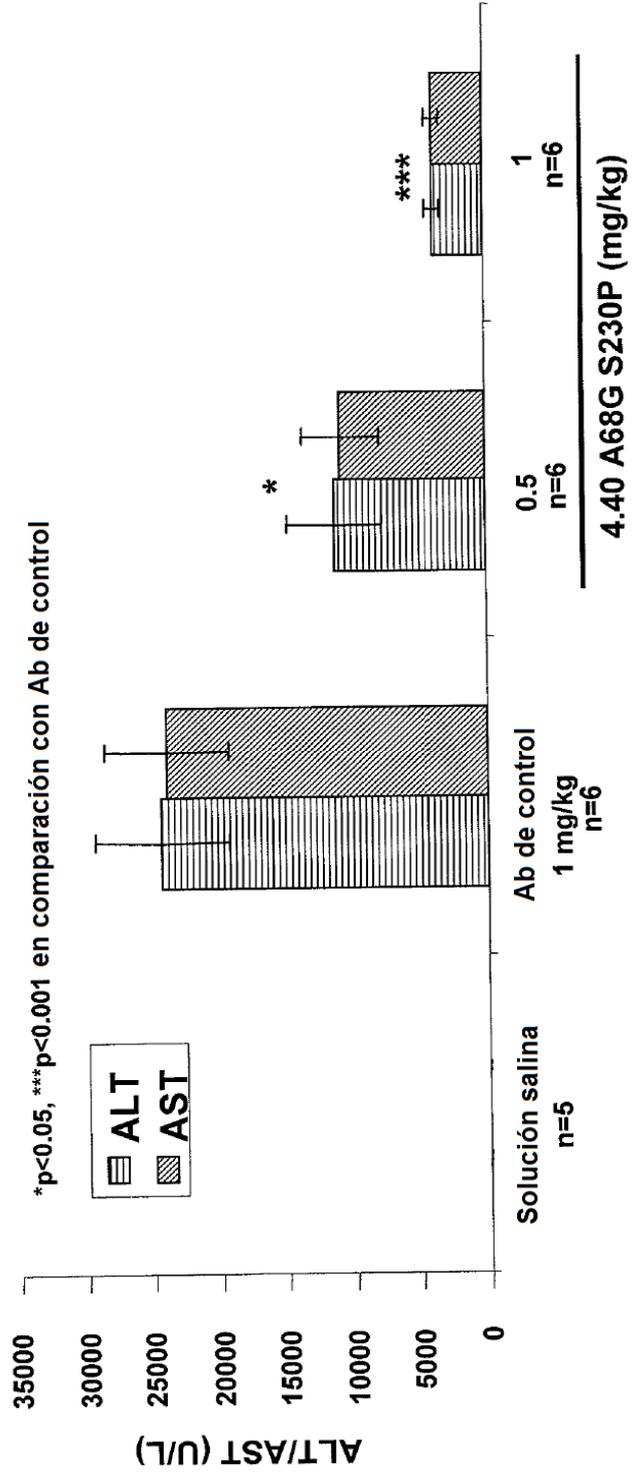


Figura 17a

```

VH
Línea germinal  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSSGGSTSYAQKFFQG
4 . 22 . 3      -----I-----M-----T-----

Línea germinal  RVTMTRDTSTVYMEISSLRSEDIAVYYCARE##YNWNY#AFDIWGQGMVTVSS SEQ ID NO:158
4 . 22 . 3      ---L-----D-----RW-K--FDV-----

VL
Línea germinal  DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLLNWFQQRPGQSPRRLLIYKVSINWDS
4 . 22 . 3      -----P-----L-----A-----

Línea germinal  GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPIITFGQGRLEIK SEQ ID NO:159
4 . 22 . 3      -----F---###-GRS--V-----
    
```

Figura 17b

V_H

Línea germinal QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
 4 . 4 0 . 2 -L-----L-----K-----

Línea germinal RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR#YNWNY##AFDIWGQGTMTVSS SEQ ID NO:160
 4 . 4 0 . 2 -----DQAYWT-FD-----

V_L

Línea germinal EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFS
 4 . 4 0 . 2 -----

Línea germinal GVPSRFSGSGGTDFLTINSLEAEADAATYYCHQSSSLPLTFGGGTTKVEIK SEQ ID NO:161
 4 . 4 0 . 2 -----A-----

Figura 17c

V_H

Línea germinal QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG

4.9.2 -----GT---R-----

Línea germinal RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR##YNNY##AFDIWGQGMVTVSS SEQ ID NO:162

4.9.2 -----K-----R-----DQAY-K-FD-----

V_L

Línea germinal DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS

4.9.2 -----T-----

Línea germinal GVPSRFSGSGGTFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGGQTKLEIK SEQ ID NO:163

4.9.2 -----NS-CS-----

Figura 17d

V_H
 Línea germinal QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSPGGSTSYAQKFFQG
 4.39.3 -----I-----M-----P-----
 Línea germinal RVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR##YNWNY#AFDIWGQGTMTVSS SEQ ID NO:164
 4.39.3 -----D-----F-----ERW-K--FD-----
 V_L
 Línea germinal DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
 4.39.3 -----
 Línea germinal GVPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK SEQ ID NO:165
 4.39.3 -----Q-----R-----