

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 173**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2012** **PCT/JP2012/072667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013** **WO13032032**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2012** **E 12761822 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2751140**

54 Título: **Anticuerpos anti-XCR1 humano**

30 Prioridad:

01.09.2011 US 201161530194 P

14.06.2012 US 201261659637 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
01.10.2018

73 Titular/es:

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)

6-10, Koishikawa 4-chome Bunkyo-ku

Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es:

SAKAMOTO, YOSHIMASA;

NISHIMURA, MIYUKI;

KAWANO, TETSU;

SAWA, YUKIHISA y

IMAI, TOSHIO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 684 173 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-XCR1 humano

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une al XCR1 humano.

Antecedentes de la técnica

10

El término "quimiocina" es un término colectivo que se refiere a proteínas básicas que se unen a la heparina, las cuales actúan sobre la quimiotaxis de leucocitos y la activación de leucocitos. Basándose en una comparación de las estructuras primarias de varias quimiocinas, las quimiocinas se clasifican en las subfamilias CXC, CC, C y CX3C, según sean las posiciones de los residuos de cisteína conservados. La XCL1 (también denominada linfotactina (Ltn) o linfotactina α (Ltn- α)) y la XCL2 (también denominada linfotactina β (Ltn- β)) son quimiocinas que pertenecen a la subfamilia C descrita previamente. El XCR1 (también denominado GPR5, SCM-1 α o ATAC) es un receptor de quimiocinas acoplado a proteínas G, que se une específicamente a XCL1 y XCL2.

15

20

Se ha examinado la expresión de XCR1 en varios tejidos humanos a nivel de ARNm. Se ha descrito que la expresión de XCR1 es elevada en la placenta, pero baja en el bazo y el timo (BIBLIOGRAFÍA NO PERTENECIENTE A PATENTES 1). Además, el XCR1 se expresa principalmente en las células dendríticas. En ratones, la expresión de XCR1 es muy elevada, particularmente en células dendríticas CD8 α + (BIBLIOGRAFÍA NO PERTENECIENTE A PATENTES 2; y BIBLIOGRAFÍA NO PERTENECIENTE A PATENTES 3). Las células dendríticas CD8 α + se encuentran presentes normalmente en tejidos linfáticos secundarios, tales como el bazo y los ganglios linfáticos, y existe constancia de que realizan una "presentación cruzada", que desempeña un papel importante en reacciones contra la infección y respuestas inmunológicas a células tumorales. También existe constancia de que la expresión de XCR1 es elevada en células dendríticas CD141+ humanas, las cuales se consideran homólogas a las células dendríticas CD8 α + en ratones (BIBLIOGRAFÍA NO PERTENECIENTE A PATENTES 4).

25

30

El antígeno captado desde el exterior de las células hacia las células presentadoras de antígenos normalmente se degrada para obtener un péptido, que se presenta en el antígeno de histocompatibilidad mayor de clase II (MHC de clase II) y es reconocido por los linfocitos T CD4+. Por el contrario, existe un caso en el que el antígeno captado desde el exterior de las células se presenta en el antígeno de histocompatibilidad mayor de clase I (MHC de clase I) mediante una ruta diferente a la ruta habitual descrita previamente. Este proceso de presentación de antígenos se denomina "presentación cruzada". En este proceso, el antígeno presentado en el MHC de clase I es reconocido por los linfocitos T CD8+ y a continuación se diferencia para obtener linfocitos T citotóxicos (LTC), que desempeñan un papel en la filaxis y la eliminación de células tumorales en el huésped (Bibliografía no perteneciente a patentes 5).

35

40

La migración de varias células relacionadas con el sistema inmunitario tiene lugar durante la reacción de inflamación. En particular, la migración de las células dendríticas hacia un punto de inflamación local tiene lugar para que se produzca la fagocitosis de los antígenos. Las quimiocinas y los receptores de quimiocinas desempeñan funciones importantes a la hora de provocar dicha migración de las células dendríticas. Después de migrar hacia un punto de inflamación local, las células dendríticas presentan los antígenos a los linfocitos T y activan los linfocitos T. Posteriormente, la información se transmite desde los linfocitos T hacia muchas otras células relacionadas con el sistema inmunitario, de manera que se amplifica la reacción inmunitaria (Bibliografía no perteneciente a patentes 6).

45

50

Entre las células presentadoras de antígenos, las células dendríticas poseen una capacidad presentadora de antígenos particularmente excelente y desempeñan un papel muy importante en la activación de los linfocitos T. Se ha sugerido que, debido a que los linfocitos T participan en el desarrollo y la exacerbación de varias enfermedades inmunitarias, incluidas las enfermedades autoinmunitarias, el hecho de controlar las células dendríticas supone controlar la activación de los linfocitos T, lo cual puede conllevar la mejora de varias enfermedades inmunitarias (Bibliografía no perteneciente a patentes 6; y Bibliografía no perteneciente a patentes 7).

Además, se ha demostrado que un anticuerpo policlonal derivado de conejo contra XCR1 humano ejerce el efecto de inhibir la migración inducida por XCL de queratinocitos orales normales y células cancerosas orales (Bibliografía no perteneciente a patentes 8).

55

Lista de citas

Bibliografía no perteneciente a patentes

60

BNP 1: Yoshida T, Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Takagi S, Yoshie O. "Identification of Single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1", J. Biol. Chem. 273: 16551-16554 (1998)

65

BNP 2: Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E, Vu Manh TP, Baranek T, Storset AK, Marvel J, Boudinot P, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I, Dalod M "The XC chemokine receptor 1 is a conserved

selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α + dendritic cells", J Exp Med, 207: 1283-1292 (2010)

BNP 3: Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, Hutloff A, Mages HW, Ranke K, Schaefer M, Jack RS, Henn V, KroczeK RA "Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T-cells", Immunity, 31: 823-833 (2009)

BNP 4: Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, Salama A, Movassaghi K, Opitz C, Mages HW, Henn V, Kloetzel PM, Gurka S, KroczeK RA, "Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells", J Exp Med, 207: 1273-1281 (2010)

BNP 5: Kurts C, Robinson BW, Knolle PA, "Cross-priming in health and disease", Nat Rev Immunol, 10: 403-414 (2010)

BNP 6: Kurts C, Robinson BW, Knolle PA, "Cross-priming in health and disease", Nat Rev Immunol, 10: 403-414 (2010)

BNP 7: Waldner H, "The role of innate immune responses in autoimmune disease development", Autoimmun, Rev 8: 400-404 (2009)

BNP 8: Khurram SA, Whawell SA, Bingle L, Murdoch C, McCabe BM, Farthing PM, "Functional expression of the chemokine receptor XCR1 on oral epithelial cells", J Pathol, 221: 153-63 (2010)

El documento WO 2009/065561 describe un anticuerpo específico para el receptor XCR1 humano.

Lei et al., Microbes Infect. marzo de 2012; 14(3): 262-7, resume la expresión y función de XCL1 y XCR1 en el sistema inmunitario.

Resumen de la invención

Problema técnico

Hasta la fecha, se ha acumulado información sobre el hecho de que las células dendríticas participan en el desarrollo, la exacerbación y similares de enfermedades inmunitarias, empleando modelos de enfermedades en animales. Sin embargo, en la actualidad no se ha desarrollado ningún método de tratamiento ni ningún método de prevención eficaz para muchas de las enfermedades inmunitarias. Además, aunque se conoce un anticuerpo anti-XCR1 humano que ejerce el efecto de inhibir la migración celular (Khurram SA, Whawell SA, Bingle L, Murdoch C, McCabe BM, Farthing PM, "Functional expression of the chemokine receptor XCR1 on oral epithelial cells", J Pathol, 221: 153-63 (2010)), debido a que este anticuerpo es un anticuerpo policlonal derivado de conejo, es poco probable que se pueda aplicar clínicamente de forma inmediata como un producto farmacéutico. Adicionalmente, el documento anterior no sugiere que un anticuerpo de este tipo inhiba la migración celular de células dendríticas y resulta imposible incluso predecir si un anticuerpo de este tipo sería eficaz en el tratamiento o la prevención de enfermedades inmunitarias.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticupero monoclonal que se una selectivamente al XCR1 humano; preferentemente, un anticuerpo monoclonal que se una selectivamente al XCR1 humano e inhiba la migración celular; aún más preferentemente, un anticuerpo que sea eficaz en el tratamiento o la prevención de enfermedades inmunitarias, en particular enfermedades inmunitarias de la piel, basándose en el efecto descrito anteriormente.

Solución al problema

Los inventores de la presente han realizado estudios exhaustivos para intentar solucionar el problema anterior. Como resultado, han desarrollado anticuerpos que se unen al XCR1 humano y han descubierto que estos anticuerpos ejercen el efecto de inhibir la migración celular, así como también ejercen un efecto significativo en el tratamiento o la prevención de enfermedades inmunitarias, tales como enfermedades inmunitarias de la piel, asociadas con la migración de células dendríticas.

En lo sucesivo, en la presente memoria descriptiva, los anticuerpos descritos previamente se denominan en ocasiones simplemente "anticuerpos", "anticuerpos de la presente invención" o "anticuerpos anti-XCR1 humano".

Ventajas de la invención

Los anticuerpos de la presente invención se unen al XCR1 humano, tal como está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen un anticuerpo que inhibe la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana. Un anticuerpo de este tipo tiene potencial como principio activo que se añade a un inhibidor de la unión XCR1 humano-XCL1 humana.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen un anticuerpo que inhibe la migración celular, particularmente la de las células dendríticas. Un anticuerpo de este tipo tiene potencial como principio activo que se añade a un inhibidor de la migración celular, particularmente un inhibidor de la migración de células dendríticas. Además, los anticuerpos de la presente invención también incluyen un anticuerpo que reconoce específicamente células positivas para BDCA3 (también denominada CD141). Por consiguiente, una composición farmacéutica que comprenda los anticuerpos de la presente invención tiene potencial como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inmunitarias asociadas con la migración celular, particularmente la migración de células dendríticas. En particular, la composición farmacéutica tiene potencial como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inmunitarias de la piel tales como hipersensibilidad retardada, psoriasis, parapsoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad ampollosa autoinmune (p. ej., pénfigo, penfigoide o epidermólisis ampollosa adquirida), pustulosis, esclerodermia sistémica, herpes gestationis, dermatosis ampollosa IgA lineal, alopecia areata, vitiligo vulgaris, enfermedades de la piel asociadas con colagenosis (p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren o enfermedad mixta del tejido conectivo), enfermedades de la piel asociadas con la enfermedad de Addison, enfermedades de la piel asociadas con la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), eczema y urticaria.

Además de estas enfermedades inmunitarias de la piel, los anticuerpos de la presente invención también tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunitarias tales como diabetes mellitus de tipo 1, glomerulonefritis, hepatitis autoinmune, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, tiroiditis, rechazo del injerto, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, uveítis anterior, granulomatosis de Wegener o enfermedad de Behçet.

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La Fig. 1 muestra los resultados del análisis por FACS para la reactividad de los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) frente a células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano.

[Fig. 2] La Fig. 2 muestra los resultados del análisis para un ensayo de quimiotaxis de la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) en la migración inducida por linfotactina humana de células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano.

[Fig. 3] La Fig. 3 muestra los resultados del análisis por FACS para la reactividad de los anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados (HK1L2 y HK5L5) frente a células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano, en paralelo con la reactividad de su anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón inicial (5G7) y su anticuerpo quimérico.

[Fig. 4] La Fig. 4 muestra los resultados del análisis por FACS para la reactividad del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7) y los anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados (HK1L2 y HK5L5) frente a células dendríticas BDCA3+ humanas.

[Fig. 5] La Fig. 5 muestra los resultados del análisis para un ensayo de quimiotaxis de la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados (HK1L2 y HK5L5) en la migración inducida por linfotactina humana de células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano, en paralelo con la actividad neutralizante de su anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón inicial (5G7) y su anticuerpo quimérico.

[Fig. 6] La Fig. 6 muestra los resultados del análisis para un ensayo de migración transendotelial de la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados (HK1L2 y HK5L5) y un anticuerpo quimérico en la migración inducida por linfotactina humana de células dendríticas BDCA3+ humanas, en paralelo con un anticuerpo de control de isotipo (IgG2 humana, κ).

[Fig. 7] La Fig. 7 muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos de las CDR 1-3 de la cadena pesada y las CDR 1-3 de la cadena ligera de los anticuerpos de la presente invención.

La figura también muestra las secuencias de aminoácidos generalizadas de las CDR 1-3 de la cadena pesada y las CDR 1-3 de la cadena ligera.

[Fig. 8] La Fig. 8 muestra el efecto farmacológico del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7) de la presente invención en un modelo de dermatitis retardada por contacto (DRC) en ratones.

Las Figs. 8A y 8B, respectivamente, muestran los resultados obtenidos al comparar el grado de inflamación auricular (mm) 24 horas y 48 horas después de la inducción con DNFB entre el anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7) de la presente invención y el anticuerpo de control.

[Fig. 9] La Fig. 9 muestra la especificidad de unión del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7) de la presente invención a varios receptores humanos de quimiocinas. El eje de las abscisas de la gráfica en la figura indica la intensidad de fluorescencia de la ficoeritrina (PE).

[Fig. 10] La Fig. 10 muestra las secuencias de aminoácidos del XCR1 humano a las cuales se unen los anticuerpos de la presente invención.

[Fig. 11] La Fig. 11 muestra la citotoxicidad para células que expresan XCR1 humano, empleando los anticuerpos de la presente invención.

[Fig. 12] La Fig. 12 muestra el análisis del resultado del ensayo de linfocitos T citotóxicos del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7) de la presente invención.

[Fig. 13] La Fig. 13 muestra la reactividad de anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) de la presente invención respecto a las células que expresan XCR1 humano/de ratón quimérico.

[Fig. 14] La Fig. 14 muestra el análisis del resultado del mapeo de los sitios de unión de anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6 y 5G7) en dominios extracelulares de XCR1 humano mediante ELISA peptídico.

[Fig. 15] La Fig. 15 muestra el análisis del resultado del mapeo de los sitios de unión de anticuerpos anti-XCR1 humano policlonales en dominios extracelulares de XCR1 humano utilizando mutantes de alanina.

[Fig. 16] La Fig. 16 muestra el análisis del resultado del mapeo de los sitios de unión de anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6) en dominios extracelulares de XCR1 humano utilizando mutantes de alanina.

[Fig. 17] La Fig. 17 muestra el análisis del resultado del mapeo de los sitios de unión de anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (5G7) en dominios extracelulares de XCR1 humano utilizando mutantes de alanina.

[Fig. 18] La Fig. 18 muestra el análisis del resultado del mapeo de los sitios de unión de anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (11H2) en dominios extracelulares de EXR1 humano utilizando mutantes de alanina.

[Fig. 19] La Fig. 19 muestra el análisis del resultado del mapeo de los sitios de unión de anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados (HK1L2) en dominios extracelulares de XCR1 humano utilizando mutantes de alanina.

[Fig. 20] La Fig. 20 muestra el análisis del resultado del mapeo de los sitios de unión de anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados (HK5L5) en dominios extracelulares de XCR1 humano utilizando mutantes de alanina.

[Fig. 21] La Fig. 21 muestra el análisis del resultado de la competición entre anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) por la unión a células que expresan XCR1 humano.

[Fig. 22] La Fig. 22 muestra la especificidad de unión del anticuerpo anti-XCR1 humano monoclonal producido en ratón (5G7) y anticuerpo anti-XCR1 humano policlonal producido en cabra comercial a varios receptores de quimiocinas humanas. El eje de abscisas del gráfico en la figura indica la intensidad de fluorescencia de la ficoeritrina (PE).

[Fig. 23] La Fig. 23 muestra la especificidad de unión del anticuerpo anti-XCR1 humano monoclonal producido en ratón (5G7) y anticuerpos anti-XCR1 humano monoclonales humanizados (HK1L2 y HK5L5) a varios receptores de quimiocinas humanas. El eje de abscisas del gráfico en la figura indica la intensidad de fluorescencia de la ficoeritrina (PE).

[Fig. 24] La Fig. 24 muestra un efecto farmacológico del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7) de la presente invención en un modelo de dermatitis retardada por contacto (DRC) inducida por *Mycobacterium butyricum* en ratones.

[Fig. 25] La Fig. 25 muestra un efecto farmacológico del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7) de la presente invención en un modelo de esclerosis múltiple (EM) por encefalomeningitis autoinmune experimental (EAE) en ratones.

[Fig. 26] La Fig. 26 muestra el análisis del resultado del ensayo de unión competitiva de ligandos para anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón de la presente invención.

Descripción de las realizaciones

Varias técnicas empleadas para llevar a la práctica la presente invención pueden ser aplicadas fácilmente y de forma fiable por un experto en la técnica basándose en documentos conocidos y similares, excepto aquellas técnicas cuya

procedencia se identifica claramente en la presente. Por ejemplo, en cuanto a las técnicas de ingeniería genética y biología molecular, se puede hacer referencia a documentos tales como Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, (2001); y Ausubel, F M et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York, NY.

Además, en cuanto a las técnicas de ingeniería de anticuerpos, se puede hacer referencia a documentos tales como Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de Sanidad y Servicios Humanos de los EE. UU. (1983); y Kontermann y Dübeler, "Antibody Engineering", Springer.

Explicación de los términos y las expresiones

La expresión "ácido nucleico" engloba, por ejemplo, ribonucleótidos, desoxiribonucleótidos y sus formas modificadas. El ácido nucleico puede ser mono- o bicatenario, y puede ser polinucleótido u oligonucleótido.

El término "proteína" se refiere a un compuesto en el que dos o más aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Dicho de otra forma, los anticuerpos individuales incluidos en la población son idénticos, excepto por mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen a un sitio antigénico único. Además, a diferencia de los preparados de anticuerpos policlonales que comprenden diferentes anticuerpos que se dirigen a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige a un determinante único del antígeno. Además de sus especificidades, los anticuerpos monoclonales también presentan ventajas en el sentido de que se pueden sintetizar sin contaminación por parte de otros anticuerpos. El descriptor "monoclonal" se refiere a una característica de un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, y no se debe interpretar que se refiera a que los anticuerpos se deben producir mediante ningún método específico.

Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se deba emplear de acuerdo con la presente invención se puede preparar mediante el método de hibridomas descrito por primera vez por Köhler G y Milstein C, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature, 256: 495-7 (1975) o mediante un método de ADN recombinante (remítase a la patente de los EE. UU. N.º 4816567).

Además, los "anticuerpos monoclonales" se pueden aislar a partir de colecciones de anticuerpos en fagos empleando una técnica, por ejemplo, la descrita por Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD y Winter G, "Making antibody fragments using phage display libraries", Nature, 352: 624-8 (1991); o Marks JD, Hoogenboom HR y Bonner TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, "By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage", J Mol Biol, 222: 581-97 (1991).

La "identidad" entre secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos se refiere al grado de secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos idénticas entre dos o más secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos comparables. Por consiguiente, cuando la identidad entre dos secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos es elevada, la identidad o similitud de estas secuencias es elevada. El nivel de identidad entre secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos se determina, por ejemplo, empleando FASTA, que es una herramienta de análisis de secuencias basada en parámetros por defecto.

Como alternativa, se puede determinar empleando el algoritmo BLAST de Karlin y Altschul (Karlin S, Altschul SF, "Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes", Proc Natl Acad Sci USA, 87: 2264-2268 (1990); y Karlin S, Altschul SF, "Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences", Proc Natl Acad Sci USA, 90: 5873-7 (1993)). Se han desarrollado programas, tales como BLASTN y BLASTX, basados en el algoritmo BLAST descrito anteriormente (Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, "Basic local alignment search tool", J Mol Biol, 215: 403-10 (1990)). Por ejemplo, cuando se analiza la secuencia de nucleótidos, se puede emplear BLASTN, ajustando, como parámetros, la puntuación a 100 y la longitud de palabra a 12.

Además, cuando se analiza la secuencia de aminoácidos, se puede emplear BLASTX, ajustando, por ejemplo, como parámetros, la puntuación a 50 y la longitud de palabra a 3.

Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden emplear los parámetros por defecto de cada programa. Se conocen técnicas específicas de estos métodos de análisis. Se debe hacer referencia a la página web del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Anticuerpo anti-XCR1 humano

Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos aislados.

Los anticuerpos de la presente invención se unen al XCR1 humano. La secuencia de aminoácidos del XCR1 humano es una secuencia de aminoácidos que se presenta como la Secuencia de Referencia del NCBI siguiente: NP_001019815.1 o NP_005274.1. Con relación a estas secuencias de aminoácidos, se debe hacer referencia a las

5 páginas web del NCBI (respectivamente, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001019815.1 y http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_005274.1).

Un anticuerpo específico de la presente invención es tal como se define en las reivindicaciones 1-13.

10 El término "CDR", definido con relación a los anticuerpos de la presente invención, es una abreviatura para región determinante de la complementariedad y también se denomina región determinante de la complementariedad. Las CDR están presentes en la región variable de la inmunoglobulina y desempeñan un papel importante en la unión específica de un anticuerpo a un antígeno. Además, la expresión "CDR de la cadena ligera" se refiere a una CDR

15 que está presente en la región variable de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina, y la expresión "CDR de la cadena pesada" se refiere a una CDR que está presente en la región variable de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina.

Además, la expresión "región variable" se refiere a una región que incluye de las CDR 1 a las CDR3 descritas previamente (en lo sucesivo en la presente denominadas "CDR 1-3"). Aunque el orden de disposición de las CDR 1-3 no está particularmente limitado, preferentemente CDR 1, CDR 2 y CDR 3 se disponen en este orden o en el

20 orden opuesto, desde el extremo N terminal hacia el extremo C terminal, de manera secuencial o mediante otras secuencias de aminoácidos denominadas regiones de entramado (FR). Además, la "región variable de la cadena pesada" es una región en la que encuentran las CDR 1-3 de la cadena pesada descritas anteriormente y la "región variable de la cadena ligera" es una región en la que se encuentran las CDR 1-3 de la cadena ligera descritas

25 anteriormente.

Según se ha descrito previamente, la región que no se corresponda con las CDR 1-3 descritas anteriormente en cada región variable se denomina región de entramado (FR). En particular, la región entre el extremo N terminal y la CDR 1 en cada región variable se define como FR 1, la región entre la CDR 1 y la CDR 2 se define como FR 2, la

30 región entre la CDR 2 y la CDR 3 se define como FR 3 y la región entre la CDR 3 y el extremo C terminal en cada región variable se define como FR 4.

Las FR también desempeñan una función como secuencias conectoras para conectar las CDR 1-3 que son particularmente importantes como secuencias de reconocimiento del antígeno. Las FR son las regiones que

35 participan en la formación de la estructura tridimensional de toda la región variable.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención son tal como son definidos por las reivindicaciones 1-13.

Las estructuras moleculares de los anticuerpos de la presente invención no se limitan a las de la inmunoglobulina en la medida en que los anticuerpos poseen las regiones variables de la cadena ligera y pesada descritas

40 anteriormente. Los ejemplos de estructuras específicas incluyen estructuras moleculares F(ab')₂ que no comprenden la región Fc; Fab que se forma a partir de la digestión de la inmunoglobulina por parte de la papaína y que se compone de dominios CH1 y CL, así como de las regiones variables de la cadena ligera y pesada; Fv que no comprende la región constante de la inmunoglobulina; y scFv, que es un anticuerpo Fv de cadena única.

45

Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser multivalentes, en cuyo caso se combinan las estructuras moleculares anteriores. Un anticuerpo multivalente de este tipo se forma mediante una técnica de

50 acumulación de constructos scFv, como en un constructo scFv-Fc formado por la combinación de la región Fc y el constructo scFv descrito anteriormente; y un constructo denominado minicuerpo, formado por la combinación del dominio CH3 de la región constante y el constructo scFv descrito anteriormente. El término "multivalente" se refiere a la presencia de múltiples sitios de unión al antígeno. Con relación a los anticuerpos de la presente invención, el término se emplea con el mismo significado, como la presencia de múltiples sitios de unión al XCR1 humano.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden contener una región constante humana, además de las

55 regiones variables de la cadena ligera y pesada descritas anteriormente.

En la inmunoglobulina, la "región constante" de las cadenas pesadas comprende los dominios denominados CH1, CH2 y CH3; y la "región constante" de las cadenas ligeras comprende un dominio denominado CL.

60 Según se ha descrito anteriormente, cuando los anticuerpos de la presente invención contienen la región constante, es preferible que la región variable de la cadena pesada esté conectada a al menos uno de los dominios CH1, CH2 y CH3, y que la región variable de la cadena ligera esté conectada a CL. Además, preferentemente la región variable de la cadena pesada está conectada directamente a CH1.

65 La región constante de los anticuerpos de la presente invención es una región constante derivada de la inmunoglobulina humana, preferentemente una región constante derivada de la inmunoglobulina IgG humana. El

subtipo de la inmunoglobulina IgG humana no está particularmente limitado y se puede seleccionar adecuadamente, por ejemplo, según si se desea conferir actividad ADCC, actividad CDC y similares, que se describen a continuación, a los anticuerpos.

- 5 La expresión "actividad ADCC" es una abreviatura de actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Es una actividad según la cual las células, tales como las células NK, que expresan receptores específicos para la región Fc de los anticuerpos se unen a dichos anticuerpos y dañan las células presentes en la cercanía de los anticuerpos. Adicionalmente, la expresión "actividad CDC" es una abreviatura para la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento. En el caso de los seres humanos, el subtipo de IgG que presenta una actividad
10 ADCC y/o CDC elevada es IgG1, y el subtipo de IgG que presenta una actividad ADCC y/o CDC baja es IgG2 o IgG4.

- Los residuos de aminoácidos en la región Fc de los anticuerpos de la presente invención se pueden mutar con el fin de inducir un cambio de la actividad ADCC y/o CDC. Las mutaciones que se pueden introducir no están particularmente limitadas y se pueden introducir mutaciones conocidas. Por ejemplo, se pueden introducir las
15 siguientes mutaciones en la región constante de IgG1 con el fin de aumentar la actividad ADCC: S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L y similares (Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI, "Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function", Proc Natl Acad Sci USA, 103: 4005-10 (2006)); y S298A, K334A, S298A/K334A, S298A/E333A/K334A, etc., (Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG, "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R", J Biol Chem, 276: 6591-604 (2001)).

- 25 Los ejemplos de mutaciones que aumentan la actividad CDC incluyen S267E, H268F, S324T, S267E/H268F, S267E/S324T, H268F/S324T, S267E/H268F/S324T (Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA, "Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions", MAbs, 2:181-9 (2010)).

- De forma adicional, se pueden introducir mutaciones conocidas con el fin de reducir la actividad ADCC, por ejemplo, V234A/G237A (Cole MS, Anasetti C, Tso JY, "Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells", J Immunol, 159:3613-21 (1997)), H268Q/V309L/A330S/P331S (An Z, Forrest G, Moore R, Cukan M, Haytko P, Huang L, Vitelli S, Zhao JZ, Lu P, Hua J, Gibson CR, Harvey BR, Montgomery D, Zaller D, Wang F, Strohl W, "IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function", MAbs, 1:572-9 (2009)) y similares.

- 35 La numeración de los aminoácidos descritos anteriormente que se deben mutar está de acuerdo con la numeración Eu (remítase a las secuencias de proteínas de interés inmunológico, Publicación del NIH N.o 91-3242).

Anticuerpo quimérico

- 40 Entre los anticuerpos de la presente invención, un anticuerpo en el que las regiones variables de la cadena ligera y pesada comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de especies no humanas y la región constante comprende secuencias de aminoácidos derivadas de seres humanos se define como un "anticuerpo quimérico".

- Una primera realización del anticuerpo quimérico de la presente invención es un anticuerpo quimérico que
45 comprende una cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 14.

- Según se muestra en la Tabla 5, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 17-19 entre las CDR 1-3 de la cadena pesada descritas anteriormente en la región variable de la cadena pesada. Además, según se muestra en la Tabla 5, la secuencia de aminoácidos de la
50 SEQ ID NO: 14 comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 20-22 entre las CDR 1-3 de la cadena ligera descritas anteriormente en la región variable de la cadena ligera.

- El anticuerpo quimérico de la presente invención comprende variantes generadas por mutaciones en la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y/o la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, en la medida en que estas mutaciones no anulen la capacidad de unión del anticuerpo quimérico al XCR1 humano.

- Estas variantes en las cadenas ligera y pesada se obtienen preferentemente introduciendo mutaciones en al menos una cualquiera de las regiones de FR 1 a FR 4 (denominadas en lo sucesivo en la presente "FR 1-4") de la región variable, o al menos un sitio en la región constante de las secuencias de aminoácidos respectivas de las SEQ ID
60 NOs: 13 y 14.

- El número específico de mutaciones introducidas en las cadenas ligera y pesada no está particularmente limitado. Normalmente las mutaciones se introducen para obtener una variante que presente una identidad de un 85% o superior, preferentemente una identidad de un 90% o superior, más preferentemente una identidad de un 95% o superior.

superior y, de la forma más preferida, una identidad de un 99% o superior con la secuencia de aminoácidos antes de la mutación.

El término "mutación" empleado en la presente incluye sustitución, delección, inserción y similares. Se puede emplear un método conocido sin limitación específica como método específico para introducir las mutaciones. Por ejemplo, en el caso de la sustitución, se puede emplear una sustitución conservativa. La expresión "sustitución conservativa" se refiere a una sustitución de un residuo de aminoácido con otro residuo de aminoácido que contiene una cadena lateral similar.

Por ejemplo, una sustitución entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales básicas, tales como lisina, arginina e histidina, se corresponde con una sustitución conservativa. Además, las siguientes sustituciones entre residuos de aminoácidos también se corresponden con sustituciones conservativas: sustituciones entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; sustituciones entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga tales como glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina y cisteína; sustituciones entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales no polares tales como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano; sustituciones entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales β -ramificadas tales como treonina, valina e isoleucina; y sustituciones entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas tales como tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina.

Anticuerpos humanizados

Entre los anticuerpos de la presente invención, el anticuerpo que comprende las CDR 1-3 descritas anteriormente en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, en las que las FR 1-4 comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de ser humano o una de sus variantes, se define como un "anticuerpo humanizado".

Estas FR que comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de ser humano no están particularmente limitadas y se pueden determinar basándose en una técnica conocida.

Los ejemplos de estas FR incluyen regiones o subregiones de entramado completamente humanas, siendo preferibles las FR derivadas de secuencias de líneas germinales humanas. De forma adecuada, se debe hacer referencia, por ejemplo, a la página web del NCBI, que muestra una lista de las secuencias de FR conocidas actualmente como ejemplos de regiones o subregiones de entramado completamente humanas.

Los ejemplos no limitantes de las secuencias de la región variable de la cadena pesada humana incluyen 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.

Los ejemplos no limitantes de las secuencias de la región variable de la cadena ligera humana incluyen VL1-11, VL1-13, VL1-16, VL1-17, VL1-18, VL1-19, VL1-2, VL1-20, VL1-22, VL1-3, VL1-4, VL1-5, VL1-7, VL1-9, VL2-1, VL2-11, VL2-13, VL2-14, VL2-15, VL2-17, VL2-19, VL2-6, VL2-7, VL1-8, VL3-2, VL3-3, VL3-4, VL4-1, VL4-2, VL4-3, VL4-4, VL4-6, VL5-1, VL5-2, VL5-4 y VL5-6.

Las FR completamente humanas se seleccionan entre estos genes de líneas germinales funcionales. Normalmente cada una de estas FR es diferente debido a la modificación de un número limitado de aminoácidos. Estas FR se pueden emplear combinadas con las CDR descritas en la presente memoria descriptiva. Algunos ejemplos no limitantes adicionales de FR humanas que se pueden emplear combinadas con las CDR descritas anteriormente incluyen KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM. Con relación a los ejemplos de estas FR humanas, se puede hacer referencia a los siguientes documentos: Kabat, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de Sanidad y Servicios Humanos de los EE. UU., NIH (1991) EE. UU.; Wu TT, Kabat EA, "An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity", J Exp Med, 132: 211-50 (1970); y similares.

Una primera realización del anticuerpo humanizado de la presente invención es un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 o la SEQ ID NO: 64, y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 68 o la SEQ ID NO: 72.

Una realización más preferible es un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68, o un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72.

Según se muestra en las Tablas 11-1 y 12-1, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 y la SEQ ID NO: 64 comprenden las CDR 1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 17-19 entre las CDR 1-3 de

la cadena pesada descritas anteriormente en la región variable de la cadena pesada. Según se muestra en las Tablas 13-1 y 14-1, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 y la SEQ ID NO: 72 comprenden las CDR 1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 20-22 entre las CDR 1-3 de la cadena ligera descritas anteriormente en la región variable de la cadena ligera.

El anticuerpo humanizado de la presente invención comprende variantes generadas por mutaciones en la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 o 64 y/o la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 o 72, en la medida en que estas mutaciones no anulen la capacidad de unión al XCR1 humano. Estas variantes en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada se obtienen preferentemente introduciendo mutaciones en las FR 1-4 respectivas.

El número específico de mutaciones en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada no está particularmente limitado. Normalmente las mutaciones se introducen para obtener una variante que presente una identidad de un 85% o superior, preferentemente una identidad de un 90% o superior, más preferentemente una identidad de un 95% o superior y, de la forma más preferida, una identidad de un 99% o superior con la secuencia de aminoácidos antes de la mutación.

El término "mutación" empleado en la presente incluye sustitución, delección, inserción y similares. Del mismo modo que en el caso del anticuerpo quimérico descrito anteriormente, se puede emplear la sustitución conservativa y similares como un método específico para introducir mutaciones.

La segunda realización del anticuerpo humanizado de la presente invención incluye un anticuerpo que comprende una región constante humana. Los ejemplos de este incluyen un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 o 63 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 o 71.

Una realización más preferible es un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, o un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71.

Según se muestra en la Tabla 11-1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 60 y, por consiguiente, comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 17-19 entre las CDR 1-3 de la cadena pesada descritas anteriormente. Además, según se muestra en la Tabla 13-1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 68 y, por consiguiente, comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 20-22 entre las CDR 1-3 de la cadena ligera descritas anteriormente.

La cadena ligera y/o pesada descrita anteriormente comprende variantes generadas por mutaciones, en la medida en que estas mutaciones no anulen la capacidad de unión al XCR1 humano. Estas variantes en las cadenas ligera y pesada se obtienen preferentemente introduciendo mutaciones en las FR 1-4 o la región constante.

El número específico de mutaciones en las cadenas ligera y pesada no está particularmente limitado. Normalmente las mutaciones se introducen para obtener una variante que presente una identidad de un 85% o superior, preferentemente una identidad de un 90% o superior, más preferentemente una identidad de un 95% o superior y, de la forma más preferida, una identidad de un 99% o superior con la secuencia de aminoácidos antes de la mutación.

El término "mutación" empleado en la presente incluye sustitución, delección, inserción y similares. Del mismo modo que en el caso del anticuerpo quimérico descrito anteriormente, se puede emplear la sustitución conservativa y similares como un método específico para introducir mutaciones.

Función de los anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención se unen al XCR1 humano. El significado del término "unirse" empleado en la presente engloba, al menos, la unión a través de enlaces hidrófobos y similares, como se observa en el caso de una interacción entre proteínas. Dicho de otra forma, los anticuerpos que se unen al XCR1 humano al menos mediante uniones hidrófobas son adecuados como anticuerpos de la presente invención. Además, los anticuerpos de la presente invención y el XCR1 humano se pueden disociar o no después de la unión.

Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente al XCR1 humano. La expresión "unión específica", según se emplea en la presente, se refiere a la unión específica al XCR1 humano, lo cual significa que los anticuerpos se unen preferencialmente al XCR1 humano cuando dicho XCR1 humano está

presente de forma concurrente con moléculas distintas al XCR1 humano, en particular, moléculas con una estructura similar a la del XCR1 humano tales como un homólogo del XCR1 humano o un ortólogo del XCR1 humano.

El hecho de que los anticuerpos de la presente invención se unan específicamente al XCR1 humano no significa que se excluya la capacidad de unirse al homólogo u ortólogo del XCR1 humano descrito anteriormente.

El grado de unión de los anticuerpos de la presente invención al XCR1 humano se puede evaluar mediante una constante de la velocidad de reacción tal como un valor de K_d , K_{off} o K_{on} . Un valor de K_d es un valor que se obtiene al dividir un valor de K_{off} entre un valor de K_{on} .

La constante de la velocidad de reacción entre los anticuerpos de la presente invención y el XCR1 humano no está particularmente limitada.

Los anticuerpos de la presente invención se unen al dominio extracelular del XCR1 humano. Concretamente, los anticuerpos se unen a una o más de las siguientes regiones de aminoácidos: de 1 a 31, de 90 a 103, de 168 a 190 y de 251 a 267, que se corresponden con la región del dominio extracelular de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 91, Fig. 10) de la secuencia de referencia del NCBI descrita anteriormente: NP_001019815.1 o NP_005274.1.

Más preferentemente, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91, los anticuerpos se unen a al menos tres aminoácidos seleccionados del grupo constituido por el 8.o, 11.o, 12.o, 13.o, 14.o, 16.o, 17.o, 22.o, 23.o, 176.o y 177.o aminoácido.

La expresión "al menos tres aminoácidos" incluye, por ejemplo, tres o más aminoácidos, cuatro o más aminoácidos, cinco o más aminoácidos, seis o más aminoácidos, siete o más aminoácidos, ocho o más aminoácidos, nueve o más aminoácidos, diez o más aminoácidos, u once aminoácidos.

Cabe destacar que "epítipo", en la presente invención, también se refiere a un "determinante antigénico" e incluye "epítipo lineal" y "epítipo discontinuo". Un "epítipo lineal" es un epítipo que es reconocido por anticuerpos por la estructura primaria de su secuencia de aminoácidos, en vez de por su estructura conformacional. Un "epítipo discontinuo" es un epítipo que es reconocido por anticuerpos por la estructura conformacional de su secuencia de aminoácidos, en función de la estructura de orden superior.

Cabe destacar que un experto en la técnica puede determinar el epítipo de los anticuerpos de la presente invención modificando según proceda los métodos descritos en los ejemplos de la presente invención. Por ejemplo, el epítipo se puede determinar sintetizando una proteína o péptido que consista en una secuencia de aminoácidos deseable que quede comprendida en el dominio extracelular de la secuencia de aminoácidos del XCR1 humano utilizando un método conocido, y confirmando la unión entre la proteína o péptido obtenido y el anticuerpo mediante un método conocido. Como alternativa, el epítipo se puede determinar preparando un mutante por introducción de una mutación adecuada en aminoácidos deseados en la secuencia de aminoácidos de XCR1 humano mediante un método conocido, y confirmando si la unión entre el mutante preparado y el anticuerpo se reduce.

Según se ha descrito previamente, debido a que los anticuerpos de la presente invención se unen al XCR1 humano, los anticuerpos de la presente invención también incluyen un anticuerpo que inhibe la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana. La XCL1 humana también se denomina linfotactina (Ltn) humana o linfotactina α (Ltn- α) humana. En ocasiones esta actividad inhibitoria se denomina "actividad neutralizante" inducida por los anticuerpos de la presente invención. Debido a que el XCR1 humano está presente en la superficie celular como una proteína receptora in vivo, la inhibición de la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana por parte de los anticuerpos de la presente invención tiene lugar preferentemente en la superficie celular. Carece de importancia que los anticuerpos de la presente invención presenten actividad inhibitoria contra la unión entre el XCR1 humano y la XCL2 humana, en la medida en que los anticuerpos presenten actividad para inhibir al menos la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana. Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención también incluyen un anticuerpo que inhibe la unión, no solo entre el XCR1 humano y la XCL1 humana, sino también entre el XCR1 humano y la XCL2 humana.

Los ejemplos de células preferidas incluyen células asociadas con un sistema inmunitario que se activan mediante la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana, siendo particularmente preferibles las células dendríticas. En particular, según se muestra en los ejemplos que se describen más adelante, debido a que los anticuerpos de la presente invención reconocen específicamente las células dendríticas BDCA3+, las cuales son células dendríticas que expresan una cantidad significativa de proteínas XCR1 humanas, resulta preferible que los anticuerpos ejerzan un efecto de inhibición de la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana en células dendríticas BDCA3+.

La unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana es inhibida por los anticuerpos de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de formas de este tipo de inhibición incluyen:

(1) Los anticuerpos de la presente invención se unen al XCR1 en un sitio en el que se debería unir originariamente la XCL1 humana, lo cual provoca una obstrucción estérica para la unión a la XCL1 humana y como resultado se inhibe la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana.

5 (2) Los anticuerpos de la presente invención se unen al XCR1 humano, lo cual provoca una modificación de la estructura tridimensional del XCR1 humano, que provoca como consecuencia una modificación de la estructura del XCR1 humano al cual se debería unir la XCL1 humana y, por lo tanto, como resultado se inhibe la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana.

10 (3) Los anticuerpos de la presente invención se unen al XCR1 humano, lo cual provoca la internalización del receptor y como resultado se inhibe la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana.

La actividad inhibitoria de los anticuerpos de la presente invención contra la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana se evalúa basándose en los valores de CI50 y CI90. Estos valores se pueden obtener, por ejemplo, llevando a cabo un experimento de inhibición competitiva o similar de la unión de la XCL1 humana al XCR1 humano, empleando células que expresen proteínas XCR1 humanas en presencia de los anticuerpos de la presente invención. Se puede emplear un método conocido como método específico de un experimento de inhibición competitiva de este tipo.

20 Los anticuerpos de la presente invención incluyen un anticuerpo que ejerce el efecto de inhibir la migración celular. La expresión "migración celular" se refiere al fenómeno en el cual las células migran activamente como resultado de estímulos externos aplicados a las células y la activación inducida por un estímulo del mecanismo de transducción de señales intracelulares. Los efectos producidos por la migración celular activa varían dependiendo de las funciones de las células. Por ejemplo, en el caso de la migración celular de las células dendríticas, esta migración celular es un fenómeno que actúa como uno de los mecanismos del sistema inmunitario. En la presente invención, la actividad inhibitoria contra la migración celular se denomina en ocasiones "actividad neutralizante".

Según se ha descrito anteriormente, debido a que los anticuerpos de la presente invención inhiben adecuadamente la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana en células dendríticas, particularmente células dendríticas BDCA3+, los anticuerpos preferentemente inhibirán en particular la migración de células dendríticas, particularmente células dendríticas BDCA3+.

El XCR1 humano es un receptor acoplado a proteínas G de siete dominios transmembrana. Cuando la XCL1 humana se une al XCR1 humano, se modifica la estructura tridimensional del XCR1 humano y, como resultado, se libera una proteína G acoplada al dominio intracelular del XCR1 humano y se transduce una señal en las células.

Los anticuerpos de la presente invención evitan que se liberen las proteínas G inhibiendo la unión entre el XCR1 humano y la XCL1 humana de acuerdo con los mecanismos (1), (2) descritos anteriormente o similares. Como resultado, no se transduce ninguna señal y, por lo tanto, se inhibe el fenómeno de la migración celular.

40 Como alternativa, el fenómeno de la migración celular se puede inhibir como resultado de un mecanismo en el cual la unión de los anticuerpos de la presente invención al XCR1 humano fortalezca el enlace entre el XCR1 humano y la proteína G acoplada al dominio intracelular del XCR1 humano, de manera que como consecuencia la liberación de las proteínas G no tenga lugar y, por lo tanto, se inhiba la transducción de la señal intracelular.

La actividad inhibitoria de los anticuerpos de la presente invención contra la migración celular de células humanas se evalúa basándose en los valores de CI50 y CI90. Los valores específicos no están particularmente limitados. Por ejemplo, normalmente un valor de CI50 es de aproximadamente 0.36 M o inferior, preferentemente de aproximadamente 0.27 nM o inferior y más preferentemente de aproximadamente 0.16 nM o inferior. Por ejemplo, normalmente un valor de CI90 es de aproximadamente 2.38 M o inferior, preferentemente de aproximadamente 1.52 nM o inferior y más preferentemente de aproximadamente 0.86 nM o inferior.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen, como una realización, un anticuerpo que ejerce el efecto de reducir la actividad de linfocitos T citotóxicos (LTC). El mecanismo de reducción de la actividad de LTC consiste, por ejemplo, en que los anticuerpos de la presente invención inhiban la interacción entre el XCR1 humano y la XCL1 humana en células dendríticas. Entre las células dendríticas, se prefieren las células dendríticas BDCA3+ descritas anteriormente.

Método para preparar los anticuerpos de la presente invención

60 Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar mediante un método que comprende los tres pasos siguientes, aunque no se limita a ellos.

(i) Paso 1: introducir un vector en el huésped para transformar el huésped, comprendiendo el vector un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención;

(ii) paso 2: cultivar el huésped transformado obtenido en el paso 1 y obtener una fracción que contiene anticuerpos que se unen al XCR1 humano; y

(iii) paso 3: aislar o purificar los anticuerpos anteriores a partir de la fracción obtenida en el paso 2.

Paso 1

El ácido nucleico empleado en el paso 1 es un ácido nucleico que codifica los anticuerpos de la presente invención. La secuencia de nucleótidos del ácido nucleico anterior se puede determinar empleando una técnica in silico basada en la información de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de la presente invención. En este punto, es preferible determinar la secuencia de nucleótidos con referencia a la frecuencia del codón en el huésped empleado en el paso 2. Los ejemplos específicos de secuencias de nucleótidos incluyen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 61, 62, 65, 66, 69, 70, 73 o 74; o una de sus variantes.

La variante anterior se genera preferentemente introduciendo mutaciones (delección, sustitución, inserción o similares) en la FR o la región constante de los anticuerpos.

El número específico de mutaciones introducidas en la variante no está particularmente limitado. Normalmente las mutaciones se introducen para obtener una variante que presente una identidad de un 85% o superior, preferentemente una identidad de un 90% o superior, más preferentemente una identidad de un 95% o superior y, de la forma más preferida, una identidad de un 99% o superior con la secuencia de aminoácidos antes de la mutación.

Además, el ácido nucleico anterior puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifique un péptido señal de secreción en el extremo 5' terminal. Una secuencia de nucleótidos específica que codifica un péptido señal de secreción es preferentemente una secuencia de nucleótidos que actúa eficazmente como un péptido señal de secreción en las células huésped empleadas en el paso 2. La expresión "péptido señal de secreción" se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que actúa como una secuencia de reconocimiento para conducir proteínas o péptidos producidos en el huésped hacia una ruta para secretar las proteínas o los péptidos al exterior del huésped.

Los ejemplos de secuencias de nucleótidos que codifican un péptido señal de secreción incluyen:

ATGGGATTCAGCAGGATCTTTCTCTTCCTCTGTCAGTAACTACAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 75),

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGCTGTTCTGGTTTCCTGCTTCCAACACT (SEQ ID NO: 76),

ATGGAATGGTCATGGGTCTTTCTGTTCTTTCTGAGTGTCAACCGGGGTGCATAGC (SEQ ID NO: 77),

ATGGAATGGTCTTGGGTCTTTCTGTTCTTTCTGTCCGTCCTACTACCGGGGTCCACTCT (SEQ ID NO: 78),

ATGTCCGTGCCTACTCAGGTGCTGGGGCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGATGCTCGTTGC (SEQ ID NO: 79) y

ATGTCCGTGCCTACTCAGGTGCTGGGGCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGATGCTCGTTGT (SEQ ID NO: 80).

El vector empleado en el paso 1 comprende al menos uno de los ácidos nucleicos anteriores.

Este vector puede ser uno de los siguientes vectores:

(I) un vector que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un miembro seleccionado del grupo constituido por cadenas pesadas, la región variable de la cadena pesada y las CDR 1-3 de la cadena pesada de los anticuerpos de la presente invención;

(II) un vector que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un miembro seleccionado del grupo constituido por cadenas ligeras, la región variable de la cadena ligera y las CDR 1-3 de la cadena ligera de los anticuerpos de la presente invención; o

(III) un vector que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un miembro seleccionado del grupo constituido por cadenas pesadas, la región variable de la cadena pesada y las CDR 1-3 de la cadena pesada de los anticuerpos de la presente invención, y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un miembro seleccionado del grupo constituido por cadenas ligeras, la región variable de la cadena ligera y las CDR 1-3 de la cadena ligera de los anticuerpos de la presente invención.

El vector anterior puede ser un vector de expresión genética. El "vector de expresión genética" es un vector que ejerce la función de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico anterior. El vector de expresión genética puede contener una secuencia promotora, secuencia potenciadora, secuencia represora,

secuencia aislante y similares para controlar la expresión de la secuencia de nucleótidos. Estas secuencias no están particularmente limitadas, en la medida en que actúen en el huésped descrito previamente.

El huésped empleado en el paso 1 no está particularmente limitado, en la medida en que el gen anterior se exprese. Los ejemplos de huéspedes incluyen células de insectos, células eucariotas y células de mamíferos. De entre estas células, las células HEK, células CHO, células NS0 o células SP2/O, las cuales son células de mamíferos, son particularmente preferibles en cuanto a una expresión más eficaz de la secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos.

La técnica para introducir el vector anterior en el huésped en el paso 1 no está particularmente limitada. Se puede emplear una técnica conocida. Los vectores indicados en (I)-(III) previamente se pueden introducir en el huésped individualmente o como una combinación de dos o más.

Un huésped con el vector anterior se puede producir mediante una técnica de este tipo. El vector se puede conservar tal como se encuentra en el huésped o de manera tal que el ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos en el vector se incorpore al genoma del huésped. El huésped preparado se puede conservar empleando una técnica conocida y se puede almacenar durante un periodo largo de tiempo, si es necesario.

Paso 2

El paso 2 es un paso de cultivo del huésped descrito anteriormente obtenido en el paso 1 y de obtención de una fracción que contiene los anticuerpos de la presente invención, los cuales se unen al XCR1 humano. El cultivo del huésped conservando el vector descrito anteriormente permite que el huésped exprese la secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención basándose en el ácido nucleico del vector, lo que da como resultado la producción de los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos producidos se almacenan en el huésped o en el medio empleado para cultivar el huésped.

En el paso 2, se puede emplear un método conocido como técnica para obtener una fracción que contenga los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, para obtener una fracción que contenga los anticuerpos de la presente invención a partir del huésped, el huésped se desintegra mediante métodos físicos o químicos y la solución obtenida por desintegración se somete a un tratamiento de separación sólido-líquido; de este modo se obtiene una fracción líquida. La fracción líquida obtenida se puede emplear como la fracción que contiene los anticuerpos de la presente invención.

Por otro lado, para obtener una fracción que contenga los anticuerpos de la presente invención a partir del medio empleado para el cultivo del huésped, el medio, es decir, la solución de cultivo del huésped obtenida en el paso 1, se somete a un tratamiento de separación sólido-líquido; de este modo se obtiene una fracción líquida. La fracción líquida obtenida se puede emplear como la fracción que contiene los anticuerpos de la presente invención.

Con el fin de simplificar el paso de aislamiento o purificación en el paso 3 posterior, es preferible obtener una fracción que contenga los anticuerpos de la presente invención a partir de la solución de cultivo del huésped.

El medio empleado para el cultivo en el paso 2 no está particularmente limitado, en la medida en que el medio permita que el huésped exprese la secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención y, por lo tanto, se produzcan los anticuerpos de la presente invención. Sin embargo, cuando se obtenga una fracción que contenga los anticuerpos de la presente invención a partir de la solución de cultivo del huésped según se ha descrito previamente, será preferible emplear un medio sin suero con el fin de simplificar tanto como sea posible el paso de aislamiento o purificación en el paso 3 posterior.

Con relación a las diferentes condiciones empleadas durante el cultivo del huésped, tales como recipiente, temperatura, tiempo, concentración de huésped en el medio y condiciones de cultivo, se pueden emplear las condiciones utilizadas en un método conocido para producir anticuerpos.

Paso 3

El paso 3 es un paso de aislamiento o purificación de los anticuerpos de la presente invención, los cuales se unen al XCR1 humano, a partir de la fracción obtenida en el paso 2. El método para aislar y purificar los anticuerpos de la presente invención no está particularmente limitado. En general se puede aplicar un método empleado normalmente para aislar o purificar proteínas.

Uso medicinal de los anticuerpos de la presente invención

(1) Uso como agentes terapéuticos para enfermedades inmunitarias

Según se ha descrito anteriormente, los anticuerpos de la presente invención ejercen el efecto de inhibir los fenómenos de migración celular de células dendríticas asociadas con el sistema inmunitario. Basándose en este efecto, los anticuerpos de la presente invención, en particular el anticuerpo humanizado, tienen potencial como principio activo de una composición farmacéutica que se pueda aplicar clínicamente en seres humanos.

A continuación se explican las enfermedades en las que se pueden aplicar los anticuerpos de la presente invención.

Enfermedades aplicables (enfermedades inmunitarias)

El XCR1 está altamente expresado en células dendríticas CD141+ en el caso de seres humanos y en células dendríticas CD8α+ en el caso de ratones. Estas células dendríticas activan los linfocitos T empleando el método de presentación de antígenos descrito anteriormente denominado presentación cruzada (Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, Salama A, Movassaghi K, Opitz C, Mages HW, Henn V, Kloetzel PM, Gurka S, Kroczeck RA, "Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells", J Exp Med, 207: 1273-1281 (2010)).

Además, debido a que la fuente de producción de la XCL1, la cual es un ligando para el XCR1 humano, comprende linfocitos T, en particular linfocitos T CD8+, el sistema de quimiocinas en el cual participa XCL1-XCR1 controla la activación inducida por células dendríticas de los linfocitos T CD8+ (Croizat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E, Vu Manh TP, Baranek T, Storset AK, Marvel J, Boudinot P, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I, Dalod M "The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8α+ dendritic cells", J Exp Med, 207: 1283-1292 (2010); y Dörner BG, Dörner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, Hutloff A, Mages HW, Ranke K, Schaefer M, Jack RS, Henn V, Kroczeck RA "Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T-cells", Immunity, 31: 823-833 (2009)).

Según se ha descrito anteriormente, los anticuerpos de la presente invención incluyen, como una realización, un anticuerpo que ejerce el efecto de inhibir la unión entre la XCL1 humana y el XCR1 humano en células dendríticas, en particular células dendríticas BDCA3+. Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunitarias en las que intervienen linfocitos T que se activan mediante la migración de las células dendríticas. En particular, los anticuerpos tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades asociadas con el control de la activación de linfocitos T CD8+.

Según se ha descrito anteriormente, los anticuerpos de la presente invención incluyen, como una realización, un anticuerpo que exhibe el efecto de reducir la actividad de LTC. Los LTC tienen un mecanismo para activar el sistema inmunitario atacando células o tejidos. Se sabe que varias enfermedades inmunitarias presentan una actividad de LTC acelerada; por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención tienen potencial como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inmunitarias por reducción de la actividad de LTC.

Los ejemplos no limitantes de estas enfermedades incluyen diabetes mellitus de tipo 1, psoriasis, glomerulonefritis, hepatitis autoinmune, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, tiroiditis, rechazo del injerto, hipersensibilidad retardada, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, uveítis anterior, granulomatosis de Wegener, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedad de Behçet (Kurts C, Robinson BW, Knolle PA, "Cross-priming in health and disease", Nat Rev Immunol, 10: 403-414 (2010); Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, Assossou O, Horand F, Hahne M, Kâgi D, Kaiserlian D, Nicolas JF. "Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity", J Exp. Med. 189: 779-786 (1999); Middel P, Thelen P, Blaschke S, Polzien F, Reich K, Blaschke V, Wrede A, Hummel KM, Gunawan B, Radzun HJ, "Expression of the T-cell chemoattractant chemokine lymphotactin in Crohn's disease", Am J Pathol, 159: 1751-1761 (2001); Sugihara T, Sekine C, Nakae T, Kohyama K, Harigai M, Iwakura Y, Matsumoto Y, Miyasaka N, Kohsaka H, "A new murine model to define the critical pathologic and therapeutic mediators of polymyositis", Arthritis Rheum, 56: 1304-1314 (2007); Wang CR, Liu MF, Huang YH, Chen HC, "Up-regulation of XCR1 expression in rheumatoid joints", Rheumatology (Oxford) 43: 569-573 (2004); Muroi E, Ogawa F, Shimizu K, Komura K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S, "Elevation of serum lymphotactin levels in patients with systemic sclerosis", J Rheumatol, 35: 834-838 (2008); Torrence AE, Brabb T, Viney JL, Bielefeldt-Ohmann H, Treuting P, Seamons A, Drivdahl R, Zeng W, Maggio-Price L, "Serum biomarkers in a mouse model of bacterial-induced inflammatory bowel disease", Inflamm Bowel Dis, 14: 480-490 (2008); Yeh PT, Lin FA, Lin CP, Yang CM, Chen MS, Yang CH, "Expressions of lymphotactin and its receptor, XCR, in Lewis rats with experimental autoimmune anterior uveitis", Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 248: 1737-1747 (2010); Blaschke S, Brandt P, Wessels JT, Müller GA, "Expression and function of the C-class chemokine lymphotactin (XCL1) in Wegener's granulomatosis", J Rheumatol, 36: 2491-2500 (2009); Asuka H, Okazaki Y, Kawakami Y, Hirakata M, Inoko H, Ikeda Y, Kuwana M, "Autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes to major histocompatibility complex class I chain-related gene A in patients with Behçet's disease", Arthritis Rheum, 50: 3658-3662 (2004); Serody JS, Burkett SE, Panoskaltsis-Mortari A, Ng-Cashin J, McMahon E, Matsushima GK, Lira SA, Cook DN, Blazar BR, "T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1α is critical to the recruitment of CD8(+) T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease", Blood, 96: 2973-2980 (2000); Sugihara T, Sekine C, Nakae T, Kohyama K, Harigai M, Iwakura

Y, Matsumoto Y, Miyasaka N, Kohsaka H, "A new murine model to define the clinical pathologic and therapeutic mediators of polymyositis", *Arthritis & Rheumatism*. 56: 1304-1314 (2007)); y Dalakas MC, "Review: An update on inflammatory and autoimmune myopathies", *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37: 226-242 (2011).

También se ha puesto de manifiesto que el anticuerpo (anticuerpo monoclonal anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7)) de la presente invención inhibe significativamente la reacción de la HR en el último experimento descrito, que utilizó un modelo en ratones de hipersensibilidad retardada (en lo sucesivo en la presente denominada en ocasiones "HR"). Según se ha descrito anteriormente, la hipersensibilidad retardada es una enfermedad conocida como una de las enfermedades inmunitarias en las que intervienen linfocitos T CD8+ que se activan mediante la migración de las células dendríticas. El hecho de que los anticuerpos de la presente invención sean eficaces en el tratamiento de la hipersensibilidad retardada pone de manifiesto que los anticuerpos de la presente invención poseen actividad inhibitoria de la migración celular, en particular la migración de células dendríticas, porque los anticuerpos de la presente invención afectan a los linfocitos T CD8+.

Adicionalmente, además de la hipersensibilidad retardada, la dermatitis atópica y la dermatitis por contacto también son conocidas como enfermedades inmunitarias de la piel en las que interviene la reacción de la HR (Fabrizi G, Romano A, Vultaggio P, Bellegrandi S, Paganelli R, Venuti A, "Heterogeneity of atopic dermatitis defined by the immune response to inhalant and food allergy", *Eur J Dermatol*, 9: 380-384 (1999); y Fonacier LS, Dreskin SC, Leung DYM, "Allergic skin diseases", *J Allergy Clin Immunol*, 125: S138-149 (2010)).

Basándose en lo anterior, los anticuerpos de la presente invención tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunitarias de la piel tales como la dermatitis atópica o la dermatitis por contacto.

Se ha destacado que la activación de los linfocitos T CD8+ también puede intervenir en la reacción de la HR (Mody CH, Pain III R, Jackson C, Chen G-H, Toews GB, "CD8 Cells play a critical role in delayed-type hypersensitivity to intact *Cryptococcus neoformans*", *J Immunol*, 152: 3970-3979 (1994), etc.).

En la psoriasis, que es una enfermedad autoinmune de la piel que afecta a un gran número de pacientes, en particular en las lesiones de psoriasis crónica, se observa una invasión de linfocitos T CD8+ en la epidermis. Se considera que estas células son las principales células efectoras que provocan las lesiones de psoriasis (Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H, "Immunopathogenic mechanisms in psoriasis", *Clin Exp Immunol*, 135: 1-8 (2004)).

Basándose en lo anterior, los anticuerpos de la presente invención tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunitarias de la piel en las que interviene la activación de los linfocitos T CD8+.

Además de la hipersensibilidad retardada, la dermatitis atópica y la dermatitis por contacto, los ejemplos no limitantes de enfermedades inmunitarias de la piel en las que intervienen los linfocitos T CD8+ también incluyen dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, psoriasis, parapsoriasis, enfermedades ampollas autoinmunes (p. ej., pénfigo, penfigoide y epidermólisis ampollas adquirida), pustulosis, herpes gestationis, dermatosis ampollas IgA lineal, alopecia areata, vitiligo vulgaris, enfermedades de la piel asociadas con colagenosis (p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren y enfermedad mixta del tejido conectivo), enfermedades de la piel asociadas con la enfermedad de Addison, enfermedades de la piel asociadas con la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), eczema y urticaria.

A continuación en la presente se describe la relación entre los anticuerpos de la presente invención y varias enfermedades inmunitarias (esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 humana, glomerulonefritis, hepatitis autoinmune, tiroiditis, enfermedad de injerto contra huésped, dermatomiositis, polimiositis y miositis por cuerpos de inclusión). Las enfermedades para las cuales son eficaces los anticuerpos de la presente invención no se limitan a las siguientes enfermedades específicas.

Esclerosis múltiple

Recientemente se ha descrito la invasión de linfocitos T CD8+, además de los linfocitos T CD4+, en las lesiones centrales en la esclerosis múltiple en seres humanos. Además, se ha descrito que, en un experimento empleando ratones, la implantación de linfocitos T CD8+ activados por un antígeno derivado de la vaina de la mielina en los nervios centrales induce encefalomeningitis autoinmune experimental, que es un modelo de esclerosis múltiple humana. En comparación con el modelo convencional, el modelo mencionado previamente se parece mucho más a la patología de la esclerosis múltiple humana (exacerbaciones y remisiones repetidas, desmielinización significativa, invasión de muchos linfocitos T CD8+ y macrófagos/células microgliales en lesiones desmielinizadas). Según se ha descrito anteriormente, se ha sugerido que los linfocitos T CD8+ desempeñan un papel importante en la esclerosis múltiple humana y en su modelo en ratones (Friese MA, Fugger L, "Autoreactive CD8+ cells in multiple sclerosis: a new target for therapy?", *Brain*, 128: 1747-1763 (2005)).

Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención que controlan la activación de los linfocitos T CD8+ tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Diabetes mellitus de tipo 1 humana

- 5 Ratones diabéticos no obesos (DNO), que representan un modelo de la diabetes mellitus de tipo 1 humana, han demostrado que la reducción de los linfocitos T CD8+ provoca la inhibición del inicio de la diabetes mellitus (Wang B, Gonzáles A, Benoist C, Mathis D, "The role CD8+ T-cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus", Eur J Immunol, 26: 1762-1769 (1996)). Esto sugiere que los linfocitos T CD8+ también intervienen en el desarrollo de la patología de la diabetes mellitus de tipo 1.
- 10 Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención que controlan la activación de los linfocitos T CD8+ tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 1 humana.

Glomerulonefritis

- 15 En un modelo de glomerulonefritis en ratones, se ha demostrado que los linfocitos T CD8+ intervienen en el proceso de formación de lesiones renales (Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer W, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Gröne H-J, Kurts C, "Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease on a mouse model of glomerular injury", J Clin Invest, 119: 1286-1297 (2009)). En pacientes con nefritis lúpica autoinmune grave, se observa la invasión de muchos linfocitos T CD8+ en el riñón. Existe constancia de la correlación entre el número de estos linfocitos T CD8+ y un aumento de la puntuación de la actividad renal y el nivel de creatinina en suero, que indican un empeoramiento de la función renal (Couzi L, Merville P, Deminière C, Moreau J-F, Combe C, Pellegrin J-L, Viallard J-F, Blanco P, "Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis", Arthritis Rheum, 56: 2362-2370 (2007)). Según se ha descrito anteriormente, se considera que los linfocitos T CD8+ intervienen en el inicio de la glomerulonefritis autoinmune o en la progresión de la patología de esta en seres humanos y en modelos con ratones.
- 20
- 25

Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención, los cuales controlan la activación de los linfocitos T CD8+, tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de la glomerulonefritis.

30

Hepatitis autoinmune

- Se ha sugerido que la infección con el virus de la hepatitis C (VHC) interviene en el proceso de desarrollo de la hepatitis autoinmune. También se ha sugerido que los LTC CD8+ inducidos con relación al VHC intervienen en el desarrollo de la hepatitis autoinmune eliminando el VHC y dañando las células hepáticas infectadas (Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KMC, Reichen J, Melief CJM, Cerny A, "Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition", J Exp Med, 190: 169-175 (1999)).
- 35
- 40 Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención, los cuales controlan la activación de los linfocitos T CD8+, tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de la hepatitis autoinmune.

Tiroiditis

- 45 Existe constancia de que los LTC CD8+ intervienen en el desarrollo de la tiroiditis autoinmune experimental (TAE), que es un modelo en ratones de la tiroiditis humana (por ejemplo, la enfermedad de Hashimoto). Se ha descrito que los ratones del modelo presentan lesiones similares a las de la tiroiditis humana (se detectan anticuerpos contra la tiroglobulina en sangre periférica y se observa la invasión de linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ en la glándula tiroides). Según se ha descrito previamente, se ha sugerido que los linfocitos T CD8+ intervienen en el desarrollo de la tiroiditis en seres humanos y en modelos con ratones (Brazillet M-P, Batteux F, Abehsira-Amar O, Nicoletti F, Charreire J, "Induction of experimental autoimmune thyroiditis by heat-denatured porcine thyroglobulin: a Tc1-mediated disease", Eur J Immunol, 29: 1342-1352 (1999)).
- 50

Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención, los cuales controlan la activación de los linfocitos T CD8+, tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de la tiroiditis humana.

55

Artritis reumatoide

- Según se describe a continuación en los ejemplos, 5G7, que es uno de los anticuerpos de la presente invención, exhibe un efecto significativo en el tratamiento de la artritis reumatoide en el experimento de DRC inducida por Mycobacterium butyricum. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención tienen potencial como agente terapéutico para el tratamiento de la artritis reumatoide.
- 60

Rechazo del injerto

65

Los linfocitos T CD8+ desempeñan un papel importante en el rechazo del injerto tras un trasplante de órganos en seres humanos. Un injerto será rechazado por los linfocitos T CD8+ en el huésped que reconozca que el MHC de clase I se está expresando en las células del injerto. Además, en pacientes con trasplante renal que experimentan rechazo, se ha descrito la invasión de muchos linfocitos T CD8+ en el riñón. Según se ha descrito anteriormente, se ha sugerido que los linfocitos T CD8+ también desempeñan un papel fundamental en el rechazo del injerto después de un trasplante de órganos en seres humanos (Bueno V, Pestana JOM, "The role of CD8+ T-cells during allograft rejection", Braz J Med Biol Res, 35: 1247-1258 (2002)).

Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención, los cuales controlan la activación de los linfocitos T CD8+, tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped.

Dermatomiositis, polimiositis y miositis por cuerpos de inclusión

Cuando los linfocitos que invaden el lugar de la lesión en pacientes con dermatomiositis y polimiositis se establecieron como líneas celulares, las líneas de linfocitos T CD8+ presentaron citotoxicidad contra sus propias células musculares cultivadas. Esto indica que los daños de las células musculares en los pacientes con las miositis descritas previamente están provocados por los linfocitos T CD8+ con citotoxicidad específica para antígenos (Hohlfeld R, Engel AG, "Coculture with autologous myotubes of cytotoxic T cells isolated from muscle in inflammatory myopathies", Ann Neurol, 29: 498-507 (1991)). Además, en pacientes con miositis por cuerpos de inclusión, se ha observado la invasión de linfocitos T CD8+ en el lugar de la lesión (Dalakas MC, "Review: An update on inflammatory and autoimmune myopathies", Neuropathol Appl Neurobiol, 37: 226-242 (2011)). Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención, los cuales controlan la activación de los linfocitos T CD8+, tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de la dermatomiositis, la polimiositis o la miositis por cuerpos de inclusión.

Según se ha descrito anteriormente, debido a que los anticuerpos de la presente invención tienen potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunitarias, en particular enfermedades inmunitarias de la piel, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la presente invención.

Esta composición farmacéutica tiene potencial como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inmunitarias, con el fin de tratar enfermedades inmunitarias, en particular enfermedades inmunitarias de la piel.

El término "tratamiento" empleado en la presente se refiere a la obtención de efectos farmacológicos y/o fisiológicos deseados. Los efectos incluyen un efecto de curación parcial o total de la enfermedad y/o los efectos adversos provocados por la enfermedad (patologías y síntomas). Los efectos anteriores también incluyen un efecto de inhibición o retraso de la progresión de la enfermedad y/o los efectos adversos provocados por la enfermedad (patologías y síntomas); un efecto de alivio de las patologías y síntomas (es decir, mejorar la enfermedad o los síntomas o provocar una inversión de la progresión de los síntomas); y un efecto de prevención de la reaparición de la enfermedad. Los efectos anteriores también incluyen un efecto de prevención parcial o total del inicio de la enfermedad y/o los efectos adversos provocados por la enfermedad (patologías y síntomas) en los individuos que puedan tener una predisposición a la enfermedad y/o los efectos adversos provocados por la enfermedad (patologías y síntomas) pero a los cuales no se les haya diagnosticado que tengan dicha predisposición. Por consiguiente, el término "tratamiento" también significa "alivio", "prevención de la reaparición" y "prevención de la enfermedad".

En la presente invención, una composición farmacéutica que comprenda los anticuerpos de la presente invención se puede emplear adecuadamente para el tratamiento de enfermedades inmunitarias humanas, en particular enfermedades inmunitarias de la piel. Se sobreentenderá que la composición farmacéutica anterior es capaz de proporcionar, por ejemplo, un efecto de curación parcial o completa de varios síntomas de enfermedades inmunitarias; un efecto de inhibición parcial o completa de varios síntomas de enfermedades inmunitarias (es decir, inhibir o retrasar la progresión); un efecto de alivio de varios síntomas de enfermedades inmunitarias (es decir, mejorar la enfermedad o los síntomas, o provocar una inversión de la progresión de los síntomas); o un efecto de prevención de la reaparición de varios síntomas de enfermedades inmunitarias.

Algunos ejemplos específicos de las enfermedades objetivo son las que se han descrito previamente, siendo preferibles las enfermedades inmunitarias de la piel.

El contenido de los anticuerpos de la presente invención en la composición farmacéutica anterior no está particularmente limitado, en la medida en que la composición farmacéutica comprenda una cantidad eficaz de los anticuerpos de la presente invención. El contenido se puede determinar adecuadamente, por ejemplo, de manera que los anticuerpos de la presente invención estén contenidos en la composición farmacéutica en una cantidad de un 0.001 a un 99.99 % en peso con relación al 100% en peso de la composición, teniendo en cuenta el tipo de enfermedad inmunitaria objetivo, la forma farmacéutica, el método de administración y similares.

La expresión "cantidad eficaz" empleada en la presente se refiere a una cantidad que hace posible que los anticuerpos de la presente invención presenten el efecto de inhibir la migración celular de las células dendríticas, o una cantidad que hace posible que los anticuerpos presenten los efectos farmacológicos y/o fisiológicos deseados descritos anteriormente (efecto de tratamiento para las enfermedades inmunitarias).

Se añaden portadores o aditivos farmacéuticamente aceptables combinados con los anticuerpos de la presente invención a la composición farmacéutica. La expresión "portadores o aditivos farmacéuticamente aceptables" empleada en la presente se refiere a portadores, diluyentes, excipientes, agentes de suspensión, lubricantes, adyuvantes, vehículos, sistemas de suministro, emulsionantes, desintegrantes, absorbentes, conservantes, surfactantes, colorantes, fragancias o edulcorantes opcionales. Se pueden emplear portadores o aditivos conocidos.

Los ejemplos no limitantes de las formas farmacéuticas de la composición farmacéutica incluyen comprimidos, jarabes, linimentos, inyecciones e infusiones, siendo preferibles las inyecciones o infusiones. Estas inyecciones o infusiones pueden presentarse en forma acuosa, no acuosa o en suspensión. Adicionalmente, la composición farmacéutica puede tener una forma farmacéutica que se prepare justo antes de la administración.

La composición farmacéutica de la presente invención, concretamente un agente terapéutico para una enfermedad inmunitaria, tiene potencial en métodos para tratar una enfermedad inmunitaria, que comprenden un paso de administración de la composición a un sujeto humano con una enfermedad inmunitaria, en particular una enfermedad inmunitaria de la piel. Según se ha descrito anteriormente, la composición farmacéutica también tiene potencial en métodos para prevenir una enfermedad inmunitaria, que comprenden administrar la composición a un sujeto humano que no haya desarrollado patologías ni síntomas de una enfermedad inmunitaria, en particular una enfermedad inmunitaria de la piel, pero que pueda poseer una predisposición a la enfermedad inmunitaria.

La cantidad de la dosis y el método de administración de la composición farmacéutica (agente terapéutico para enfermedades inmunitarias) se puede determinar adecuadamente dentro de un intervalo de 0.001 a 100 mg/kg/día, de acuerdo con el tipo de enfermedad inmunitaria, el sexo, la raza, la edad y el estado general del sujeto humano, la gravedad de la enfermedad y similares.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar con la dosis descrita previamente una vez al día o en dosis divididas varias veces al día. Además, en el intervalo en que los anticuerpos tienen un efecto de tratamiento en las enfermedades descritas previamente, el intervalo de administración puede ser de cada día, en días alternos, cada semana, en semanas alternas, cada 2-3 semanas, cada mes o cada 2-3 meses. Los ejemplos no limitantes de los métodos de administración incluyen la administración oral, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal, intradermal, intraperitoneal, intranasal, intrapulmonar, intraocular, intravaginal, intracervical, intrarectal y subcutánea.

(2) Aplicación como inmunotoxina

Los anticuerpos de la presente invención pueden haberse conjugado a moléculas citotóxicas. Debido a que estos anticuerpos se unen a la proteína XCR1 humana que se expresa en una cantidad significativa en células dendríticas asociadas con el sistema inmunitario, los anticuerpos se pueden emplear como inmunotoxinas que actúan sobre las células dendríticas.

La expresión "moléculas citotóxicas" empleada en la presente se refiere a moléculas que ejercen efectos, tales como la apoptosis y/o necrosis, que provocan la muerte celular.

Los ejemplos de estas moléculas incluyen saporina, ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de la difteria y agentes quimioterapéuticos. La unión entre el anticuerpo y una sustancia tóxica se puede llevar a cabo mediante un método empleado para preparar inmunotoxinas convencionales.

(3) Otras aplicaciones de los anticuerpos de la presente invención

Debido a que los anticuerpos de la presente invención también incluyen, como realización, un anticuerpo que se une al XCR1 que se expresa en una cantidad significativa en células dendríticas, los anticuerpos tienen potencial en un método para detectar células dendríticas. En este caso, es preferible marcar los anticuerpos de la presente invención para el uso. El término "marcar" empleado en la presente se refiere a unir los anticuerpos a moléculas marcadas tales como moléculas fluorescentes, moléculas luminiscentes, moléculas cromogénicas y moléculas radioisotópicas.

El patrón de unión no está limitado, en la medida en que el enlace no se disocie en el paso de detección. Se puede emplear un método conocido como método específico de detección. Por ejemplo, se puede emplear una técnica de citometría de flujo.

Además, los anticuerpos de la presente invención también se pueden aplicar adecuadamente en métodos para aislar y/o eliminar células dendríticas tras la detección de las células dendríticas. Para estos métodos, también se

pueden emplear métodos conocidos. Por ejemplo, se puede emplear adecuadamente un dispositivo de separación celular conocido combinado con una técnica de citometría de flujo.

La presente invención se refiere a los anticuerpos explicados anteriormente y es tal como se define en las reivindicaciones 1-14.

La presente divulgación también engloba lo siguiente:

Punto 1

Un anticuerpo que se une al XCR1 humano, donde el anticuerpo se une a epítomos lineales o discontinuos que comprenden al menos tres aminoácidos seleccionados del grupo constituido por el 8.o, 11.o, 12.o, 13.o, 14.o, 16.o, 17.o, 22.o, 23.o, 176.o y 177.o aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91.

Punto 2

El anticuerpo de acuerdo con el punto 1, donde el anticuerpo es:

el anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (g)-(i) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (j)-(l) a continuación;

el anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (m)-(o) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (p)-(r) a continuación; o

el anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (a)-(c) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (d)-(f) a continuación:

(a) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41,

(b) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42,

(c) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

(d) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44,

(e) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45, y

(f) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46;

(g) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17,

(h) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18,

(i) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(j) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20,

(k) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21,

(l) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

(m) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29,

(n) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30,

(o) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31;

(p) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32,

(q) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, y

(r) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

Punto 3

5 El anticuerpo de acuerdo con el punto 1 o 2 anterior, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 o 64, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 o 72.

Punto 4

10 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 3 anteriores, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68.

Punto 5

15 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 3 anteriores, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72.

Punto 6

20 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 5 anteriores, donde el anticuerpo comprende una región constante humana.

Punto 7

25 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 6 anteriores, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67.

Punto 8

30 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 6 anteriores, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71.

Punto 9

40 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 8 anteriores, que comprende una región Fc, donde la región Fc se ha mutado para inducir una modificación de la actividad ADCC.

Punto 10

El anticuerpo de acuerdo con el punto 9 anterior, donde la región Fc se ha mutado para reducir la actividad ADCC.

Punto 11

El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 10 anteriores, donde el anticuerpo está conjugado con una molécula citotóxica.

Punto 12

El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 11 anteriores, donde el anticuerpo inhibe la interacción entre el XCR1 humano y la XCL1 humana.

Punto 13

El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 12 anteriores, donde el anticuerpo inhibe la migración celular de células dendríticas.

Punto 14

El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 13 anteriores, donde el anticuerpo suprime la actividad de linfocitos T citotóxicos.

Punto 15

Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 14 anteriores y un portador o aditivo farmacéuticamente aceptable.

Punto 16

5 La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 15 anterior, donde la composición farmacéutica es un agente terapéutico para una enfermedad inmunitaria.

Punto 17

10 La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 16 anterior, donde la enfermedad inmunitaria es una enfermedad inmunitaria de la piel.

Punto 18

15 La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 17 anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, parapsoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad ampollosa autoinmune (pénfigo, penfigoide o epidermólisis ampollosa adquirida), pustulosis, herpes gestationis, dermatosis ampollosa IgA lineal, alopecia areata, vitiligo vulgaris, enfermedad de la piel asociada con colagenosis (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren o enfermedad mixta del tejido conectivo), enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de Addison, enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), eczema o urticaria.

Punto 19

25 La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 17 anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis o miositis por cuerpos de inclusión.

Punto 20

30 La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 17 anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es dermatitis atópica o dermatitis por contacto.

Punto 21

35 La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 16 anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es tiroiditis, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1 o esclerosis múltiple.

Punto 22

40 Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 14 anteriores.

Punto 23

45 Un método para tratar una enfermedad inmunitaria que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 14 anteriores o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto 15 anterior a un ser humano que padece una enfermedad inmunitaria.

Punto 24

50 El método de acuerdo con el punto 23 anterior, donde la enfermedad inmunitaria es una enfermedad inmunitaria de la piel.

Punto 25

55 El método de acuerdo con el punto 24 anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, parapsoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad ampollosa autoinmune (pénfigo, penfigoide o epidermólisis ampollosa adquirida), pustulosis, herpes gestationis, dermatosis ampollosa IgA lineal, alopecia areata, vitiligo vulgaris, enfermedad de la piel asociada con colagenosis (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren o enfermedad mixta del tejido conectivo), enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de Addison, enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), eczema o urticaria.

Punto 26

65

El método de acuerdo con el punto 24 anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis o miositis por cuerpos de inclusión.

Punto 27

El método de acuerdo con el punto 23 anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es tiroiditis, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1 o esclerosis múltiple.

La presente invención también contempla las realizaciones que se describen a continuación.

Punto 1-A

un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (g)-(i) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (j)-(l) a continuación;

un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (m)-(o) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (p)-(r) a continuación; o

un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (a)-(c) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (d)-(f) a continuación:

(a) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41,

(b) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42,

(c) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

(d) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44,

(e) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45, y

(f) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46;

(g) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17,

(h) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18,

(i) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(j) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20,

(k) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21,

(l) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

(m) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29,

(n) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30,

(o) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31;

(p) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32,

(q) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, y

(r) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

Punto 2-A

El anticuerpo de acuerdo con el punto 1-A anterior, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 o 64, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 o 72.

Punto 3-A

5 El anticuerpo de acuerdo con el punto 1-A o 2-A anterior, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68.

Punto 4-A

10 El anticuerpo de acuerdo con el punto 1-A o 2-A anterior, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72.

Punto 5-A

15 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-A a 4-A anteriores, que comprende una región constante humana.

Punto 6-A

20 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-A a 5-A anteriores, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67.

Punto 7-A

25 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-A a 5-A anteriores, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71.

30 Punto 8-A

El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-A a 7-A anteriores, que comprende una región Fc, donde la región Fc se ha mutado para inducir una modificación de la actividad ADCC.

35 Punto 9-A

El anticuerpo de acuerdo con el punto 8-A anterior, donde la región Fc se ha mutado para reducir la actividad ADCC.

Punto 10-A

40 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-A a 9-A anteriores, donde el anticuerpo inhibe la interacción entre el XCR1 humano y la XCL1 humana.

Punto 11-A

45 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-A a 10-A anteriores, donde el anticuerpo inhibe la migración celular de células dendríticas.

Punto 12-A

50 Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-A a 11-A anteriores y un portador o aditivo farmacéuticamente aceptable.

Punto 13-A

55 La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 12-A anterior, donde la composición farmacéutica es un agente terapéutico para una enfermedad inmunitaria.

Punto 14-A

60 La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 13-A anterior, donde la enfermedad inmunitaria es una enfermedad inmunitaria de la piel.

Punto 15-A

65

La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 14-A anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, parapsoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad ampollosa autoinmune (pénfigo, penfigoide o epidermolisis ampollosa adquirida), pustulosis, herpes gestationis, dermatosis ampollosa IgA lineal, alopecia areata, vitiligo vulgaris, enfermedad de la piel asociada con colagenosis (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren o enfermedad mixta del tejido conectivo), enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de Addison, enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), eczema o urticaria.

Punto 16-A

La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 14-A anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis o miositis por cuerpos de inclusión.

Punto 17-A

La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 14-A anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel dermatitis atópica o dermatitis por contacto.

También se divulga lo siguiente:

Punto 18-A

Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-A a 11-A anteriores.

Punto 19-A

Un método para tratar una enfermedad inmunitaria que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-A a 11-A anteriores a un ser humano que padece una enfermedad inmunitaria.

La presente invención contempla además las realizaciones que se describen a continuación.

Punto 1-B

Un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (g)-(i) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (j)-(l) a continuación;

un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (m)-(o) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (p)-(r) a continuación; o

un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (a)-(c) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (d)-(f) a continuación:

(a) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41,

(b) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42,

(c) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

(d) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44,

(e) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45, y

(f) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46;

(g) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17,

(h) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18,

(i) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(j) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20,

- (k) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21,
 (l) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;
 5 (m) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29,
 (n) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30,
 10 (o) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31;
 (p) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32,
 (q) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, y
 15 (r) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

Punto 2-B

- 20 El anticuerpo de acuerdo con el punto 1-B anterior, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 o 64, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 o 72.

Punto 3-B

- 25 El anticuerpo de acuerdo con el punto 1-B o 2-B anterior, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68.

Punto 4-B

- 30 El anticuerpo de acuerdo con el punto 1-B o 2-B anterior, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72.

Punto 5-B

- 35 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 4-B anteriores, que comprende una región constante humana.

Punto 6-B

- 40 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 5-B anteriores, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67.

Punto 7-B

- 45 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 5-B anteriores, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71.

Punto 8-B

- 50 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 7-B anteriores, que comprende una región Fc, donde la región Fc se ha mutado para inducir una modificación de la actividad ADCC.

Punto 9-B

- 60 El anticuerpo de acuerdo con el punto 8-B anterior, donde la región Fc se ha mutado para reducir la actividad ADCC.

Punto 10-B

- 65 El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 9-B anteriores, donde el anticuerpo está conjugado con una molécula citotóxica.

Punto 11-B

El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 10-B anteriores, donde el anticuerpo inhibe la interacción entre el XCR1 humano y la XCL1 humana.

Punto 12-B

El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 11-B anteriores, donde el anticuerpo inhibe la migración celular de células dendríticas.

Punto 13-B

Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 12-B anteriores y un portador o aditivo farmacéuticamente aceptable.

Punto 14-B

La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 13-B anterior, donde la composición farmacéutica es un agente terapéutico para una enfermedad inmunitaria.

Punto 15-B

La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 14-B anterior, donde la enfermedad inmunitaria es una enfermedad inmunitaria de la piel.

Punto 16-B

La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 15-B anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, parapsoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad ampollosa autoinmune (pénfigo, penfigoide o epidermólisis ampollosa adquirida), pustulosis, herpes gestationis, dermatosis ampollosa IgA lineal, alopecia areata, vitiligo vulgaris, enfermedad de la piel asociada con colagenosis (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren o enfermedad mixta del tejido conectivo), enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de Addison, enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), eczema o urticaria.

Punto 17-B

La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 15-B anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis o miositis por cuerpos de inclusión.

Punto 18-B

La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 15-B anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es dermatitis atópica o dermatitis por contacto.

También se divulga lo siguiente:

Punto 19-B

Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 12-B anteriores.

Punto 20-B

Un método para tratar una enfermedad inmunitaria que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-B a 12-B anteriores o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto 13-B anterior a un ser humano que padece una enfermedad inmunitaria.

Punto 21-B

El método de acuerdo con el punto 20-B anterior, donde la enfermedad inmunitaria es una enfermedad inmunitaria de la piel.

Punto 22-B

El método de acuerdo con el punto 21-B anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, parapsoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad ampollosa autoinmune (pénfigo, penfigoide o epidermólisis ampollosa adquirida), pustulosis, herpes gestationis, dermatosis ampollosa IgA lineal, alopecia areata, vitiligo vulgaris, enfermedad de la piel asociada con colagenosis (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren o enfermedad mixta del tejido conectivo), enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de Addison, enfermedad de la piel asociada con la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), eczema o urticaria.

Punto 23-B

El método de acuerdo con el punto 21-B anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, dermatomiositis, polimiositis o miositis por cuerpos de inclusión.

Punto 24-B

El método de acuerdo con el punto 21-B anterior, donde la enfermedad inmunitaria de la piel es dermatitis atópica o dermatitis por contacto.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe con más detalle basándose en los ejemplos. Obviamente, la presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

(1) Preparación de anticuerpos monoclonales anti-XCR1 humano producidos en ratón

Para obtener anticuerpos monoclonales contra el XCR1 humano, se inmunizaron ratones que no expresan XCR1 con una fracción de la membrana de células B300.19 que expresan XCR1 humano. La fracción de la membrana se preparó mediante el siguiente procedimiento: en primer lugar, las células B300.19 que expresan XCR1 humano, que se habían suspendido en un tampón Ho (sacarosa 0.25 M, Hepes 10 mM (pH de 7.4), EGTA 1 mM, MgCl₂ 0.5 mM, 1x "Complete mini EDTA-free" (Roche Applied Science)), se desintegraron (800 psi durante 30 minutos en hielo) en un recipiente de desintegración celular con nitrógeno gaseoso (Parr Instrument Company) y a continuación se centrifugaron (2000 g, 10 minutos). Se separó el sobrenadante y se volvió a centrifugar (100 000 g, 30 minutos). El pellet se suspendió en un tampón Hepes 50 mM (pH de 7.4) y se designó como una fracción de la membrana.

Se mezclaron 160 µg o 260 µg de esta fracción de la membrana con un volumen equivalente de adyuvante GERBU (GERBU Biotechnik GmbH) y a continuación se inyectaron por vía subcutánea en las almohadillas plantares de los ratones que no expresan XCR1 (Deltagen). A continuación, se administraron cinco o seis inyecciones adicionales cada semana alterna. Tres o cuatro días después de la inmunización final, los ratones se sacrificaron y las células periféricas de los ganglios linfáticos se fusionaron con células de mieloma P3U1 con una proporción de 2:1 o 5:1 en presencia de GenomeONE-CF (Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.). A continuación, las células fusionadas se cultivaron en placas de plástico de 96 pocillos.

Se realizó un análisis por FACS para el cribado primario. Las células CHO parentales y las células CHO que expresan EGFP-XCR1 humano se mezclaron con una proporción 1:1 y se suspendieron en un tampón FACS (EDTA 1 mM, PBS- que contenía un 1% de FBS (Sigma)). Las células se incubaron durante 20 minutos en hielo con los sobrenadantes del cultivo de cada hibridoma. Las células se lavaron con el tampón FACS tres veces y a continuación se incubaron durante 20 minutos en hielo con el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con PE (Jackson, #715-116-151, con un factor de dilución de 1:100 en el tampón FACS). Las células se lavaron con el tampón FACS tres veces y a continuación se suspendieron en el tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia empleando un analizador celular FACSCanto II (BD Bioscience). Como resultado, los sobrenadantes obtenidos de tres pocillos mostraron una reactividad elevada frente a las células CHO que expresan EGFP-XCR1 humano.

Se empleó un método de dilución limitante estándar para obtener clones de estos tres pocillos positivos (2H6, 5G7 y 11H2). La reactividad de cada clon se confirmó mediante el análisis por FACS descrito anteriormente.

Posteriormente, se realizó un ensayo de quimiotaxis in vitro para evaluar la actividad neutralizante de estos tres clones sobre la migración inducida por linfotactina humana de células BaF3 o células B300.19 que expresan XCR1 humano. El ensayo de quimiotaxis se realizó en soportes de cultivo Transwell de 24 pocillos (poro de 3 µm, Costar, #3399) o placas de cultivo Transwell de 96 pocillos (MultiScreen, poro de 5 µm, Millipore, #MAMIC 5S10).

En el caso de los soportes de cultivo Transwell de 24 pocillos, se suspendieron células BaF3 que expresan XCR1 humano (1 x 10⁶ células) en una mezcla de 50 µL de un tampón de quimiotaxis (medio RPMI 640 (Invitrogen) que contenía un 0.5% de BSA, un 0.5% de FBS y HEPES 20 mM (pH de 7.4)) y 50 µL del sobrenadante de cada cultivo,

y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió linfotactina humana recombinante (Genzyme, #2695) disuelta en el tampón de quimiotaxis con una concentración de 1 µg/mL a los pocillos inferiores en una cantidad de 600 µL/pocillo, y las células incubadas se añadieron a los pocillos superiores. Después de 4 horas de incubación en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C, los soportes Transwell se centrifugaron a 1350 rpm durante 5 minutos y las células que migraron se recogieron en los pocillos inferiores. Las células recogidas se fijaron con paraformaldehído (concentración final: 1%) y se aplicaron 30 µL de cada muestra al analizador celular FACSCanto II para contar el número de células.

En el caso de las placas de cultivo Transwell de 96 pocillos, se suspendieron células B300.19 que expresan XCR1 humano (2 x 10⁵ células) en una mezcla de 25 µL de un tampón de quimiotaxis (RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía un 0.5% de BSA, un 0.5% de FBS y HEPES 20 mM (pH de 7.4), y 2-mercaptoetanol 50 µM) y 50 µL del sobrenadante de cada cultivo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió linfotactina humana recombinante (Genzyme, #2695) disuelta en tampón de quimiotaxis con una concentración de 1 µg/mL a los pocillos inferiores en una cantidad de 150 µL/pocillo, y las células incubadas se añadieron a los pocillos superiores. Después de 4 horas de incubación en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C, las placas Transwell se centrifugaron a 1350 rpm durante 5 minutos y las células que migraron se recogieron en los pocillos inferiores. Se aplicaron 30 µL de cada muestra al analizador celular FACSCanto II para contar el número de células.

Los sobrenadantes de los cultivos producidos por tres clones de hibridomas (2H6, 5G7 y 11H2) presentaron actividad neutralizante contra la migración inducida por linfotactina humana de células BaF3 y células B300.19 que expresan XCR1 humano.

(2) Reactividad de los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) frente a células que expresan XCR1 humano

Con el fin de evaluar la reactividad y la actividad neutralizante de los anticuerpos purificados de estos tres clones, los anticuerpos se purificaron con proteína A recombinante (GE Healthcare, #17-5080-01) a partir de los sobrenadantes de los cultivos de cada clon. Se determinó el isotipo de cada clon empleando un kit para la determinación de isotipos de anticuerpos monoclonales (Serotec, #MMT1). 2H6 y 5G7 resultaron ser IgG2b, κ y 11H2 resultó ser IgG2a, κ.

La reactividad de los anticuerpos purificados frente al XCR1 humano se evaluó mediante análisis por FACS. Las células B300.19 parentales y las células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano se mezclaron con una proporción 1:1 y se suspendieron en un tampón FACS (PBS- que contenía un 1% de FBS (Sigma)). Las células se bloquearon durante 10 minutos en hielo con el tampón FACS que contenía 100 µg/mL de inmunoglobulina humana. A continuación, las células se incubaron durante 20 minutos en hielo con los anticuerpos purificados (2H6, 5G7 y 11H2) para varias concentraciones desde 0 hasta 10 µg/mL, o con el anticuerpo de control de isotipo de ratón, IgG2a (eBioscience, #14-4724-82) o IgG2b (eBioscience, #14-4732-82), para una concentración de 10 µg/mL. Las células se lavaron con el tampón FACS tres veces y a continuación se incubaron durante 20 minutos en hielo con el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con PE (Jackson, #715-116-151, con un factor de dilución de 1:50 en el tampón FACS). Las células se lavaron con el tampón FACS tres veces y a continuación se suspendieron en el tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia con un analizador celular FACSCanto II.

Estos tres anticuerpos purificados (2H6, 5G7 y 11H2) presentaron reactividad frente a las células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano, pero no frente a las células B300.19 parentales (Fig. 1). Por el contrario, el anticuerpo de control de isotipo de ratón no reaccionó con las células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano ni con las células parentales (no se muestran los datos).

(3) Actividad neutralizante de los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) contra la migración inducida por linfotactina humana de células que expresan XCR1 humano

Se evaluó la actividad neutralizante de los anticuerpos purificados de estos clones mediante un ensayo de quimiotaxis in vitro. El ensayo de quimiotaxis se llevó a cabo empleando placas de cultivo Transwell de 96 pocillos (MultiScreen, poro de 5 µm, Millipore, #MAMIC 5S10). Las células B300.19 que expresan XCR1 humano (2 x 10⁵ células) se suspendieron en 75 µL de un tampón de quimiotaxis (medio RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía un 0.5% de BSA, un 0.5% de FBS, HEPES 20 mM (pH de 7.4) y 2-mercaptoetanol 50 µM) que contenía cada uno de los anticuerpos purificados (2H6, 5G7 y 11H2) con varias concentraciones, desde 0 hasta 10 µg/mL; y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, se disolvió linfotactina humana recombinante (R&D, #695-LT/CF) en el tampón de quimiotaxis con una concentración final de 1 µg/mL, y los anticuerpos purificados se disolvieron en ella con varias concentraciones, desde 0 hasta 10 µg/mL. Se añadieron 150 µL/pocillo de la mezcla de linfotactina y anticuerpos purificados a los pocillos inferiores y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células incubadas se añadieron a los pocillos superiores 30 minutos más tarde y se incubaron en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, se aplicaron 30 µL de cada muestra al analizador celular FACSCanto II para contar el número de células. Los mAbs 2H6, 5G7 y 11H2 inhibieron completamente la migración celular para una concentración de aproximadamente 3 µg/mL. La Fig. 2 muestra el

patrón característico de una inhibición dependiente de la concentración. Los valores de CI50 y CI90 se calcularon a partir de tres experimentos independientes. La Tabla 1 muestra estos valores como la media $\pm$ error estándar.

Tabla 1

Valores de CI50 y CI90 para 2H6, 5G7 y 11H2 por análisis de quimiotaxis

	2H6	5G7	11H2
CI ₅₀ (nM)	1.28 $\pm$ 0.172	0.63 $\pm$ 0.139	0.99 $\pm$ 0.168
CI ₉₀ (nM)	7.60 $\pm$ 2.331	2.52 $\pm$ 0.645	6.32 $\pm$ 1.830

(4) Análisis de la secuencia de los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2)

Se amplificó un polinucleótido que comprendía una secuencia genética que codificaba las cadenas ligera y pesada de los clones (2H6, 5G7 y 11H2) mediante el método de 5'-RACE (amplificación rápida de extremos 5' del ADNc). El ARN total se preparó a partir del hibridoma de estos tres clones empleando TRIZOL (Invitrogen) y se trató con DNasa (QIAGEN, kit de DNasa exento de RNasa). Se preparó ADNc bicatenario a partir del ARN total, empleando un kit de síntesis de ADNc (TAKARA). El adaptador 5' obtenido por el apareamiento de ad29S; ACATCACTCCGT (SEQ ID NO: 81) y as29AS; ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT (SEQ ID NO: 82) se añadió al ADNc. El ADNc obtenido se amplificó empleando

un cebador directo 5'

(5'-cebador PCR4, AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG: SEQ ID NO: 83)

y

un cebador inverso 3'

(se empleó AGGACAGGGGTTGATTGTTGA: SEQ ID NO: 84 o

CTCAAGTTTTTGTCCACCGTGGTGC: SEQ ID NO: 85

para amplificar la cadena pesada de IgG2b;

se empleó CTCAATTTTCTTGTCCACCTTGGTGC: SEQ ID NO: 86 o

GCCAGTGGATAGACTGATG: SEQ ID NO: 87

para amplificar la cadena pesada de IgG2a; y

se empleó CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAAT: SEQ ID NO: 88,

GATGGATACAGTTGGTGCAGC: SEQ ID NO: 89 o

CAGATCCTCAGCCTCCACTCTGCT: SEQ ID NO: 90

para amplificar la cadena ligera de Igk). El ADNc amplificado se insertó en el vector pCR2.1 (Invitrogen). Las secuencias genéticas se analizaron empleando ABI3130XL. Las Tablas de 2-1 a 4-2 muestran secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias genéticas identificadas en el análisis.

Tabla 2-1

Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (2H6)

Nombre	Secuencia
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 1)	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFSSHNMHWIKQTLRQGLEWIGA IYPGKGNTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWGS VVGDWYFDWVGTTGTTVSS
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 2)	DVVVTQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKL LIYRVSNRFSQVDRFSGSLGRDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTFVPWT FGGGTKLEIK

Tabla 2-2

Secuencias de ácidos nucleicos del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (2H6)

Nombre	Secuencia
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 3)	CAGGCTTATCTACAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAGGCCTGGGGCC TCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTAGCAGTCACA ATATGCACTGGATAAAGCAGACACTTAGACAGGGCCTGGAATGGATAGG AGCTATTTATCCAGGAAAAGGTAATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAGG GCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCA GCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGA TGGGGTTCGGTAGTAGGAGACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGG ACCACGGTCACCGTCTCTTCA
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 4)	GATGTTGTGGTGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAG ATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGTAAT GGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAA AGCTCCTGATCTACAGAGTTTCCAATCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAG GTTCACTGGCAGTGGATTAGGGAGAGATTTCACTCAAGATCAGCAGA GTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACATTTGT TCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Tabla 3-1

Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7)

Nombre	Secuencia
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 5)	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSHNLHWVKQTPRQGLQWIG AIYPGNNGNTAYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARW GSVVGDWYFDWGTGTTVTSS
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 6)	DVVMQTPLSLPVTLGNQASIFCRSSLGLVHRNGNTYLHWYLRKPGQSPKL LIYKVSFRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHPWT FGGGTKLEIK

Tabla 3-2

Secuencias de ácidos nucleicos del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7)

Nombre	Secuencia
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 7)	CAGGCTTATCTTCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAGGCCTGGGGCC TCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACAGTCACA ATTTGCACTGGGTAAAGCAGACACCTAGACAGGGCCTGCAATGGATTGG AGCTATTTATCCAGGAAATGGTAATACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGG GCAAGGCCACGCTGACTGTAGACAAATCCTCCAGTACAGCCTACATGCA GCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTACTTCTGTGCAAGA TGGGGTTCGGTTGTAGGAGACTGGTACTTCGACGTCTGGGGCACAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 8)	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAA ATCAAGCCTCCATTTTTGTAGATCTAGTCTGGGCCTTGACACAGAAAT GGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAA AGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCCACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAG GTTCACTGGCAGTGGCTCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGA GTGGAGGCTGAGGATCTGGGGGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACCCATG TTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Tabla 4-1

Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (11H2)

Nombre	Secuencia
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 9)	EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYVNWVKQSHGASLEWIGV SNPKNGDKSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARGLY YAGTYGYFDWGTGTTVTSS
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 10)	DIQMTQATSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYS RLHSGVPSRFRGSGSGTDFSLTISNLEQEDIATYFCQQGKTLPRTLGGGTK LEIK

Tabla 4-2

Secuencias de ácidos nucleicos del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (11H2)

Nombre	Secuencia
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 11)	GAGGTCCAGCTTCAACAGTCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCT TCAGTGAAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACTA TGTGAAGTGGGTGAAACAGAGCCATGGAGCGAGCCTTGAGTGGATTGG AGTTAGTAATCCTAAGAACGGTGATAAAAGTTACAACCAGAAGTTCAAGG GCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCTCCAGTACAGCCTACATGGA GCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTGCAAGA GGGCTTTACTACGCTGGTACCTACGGGTACTTCGATGTCTGGGGCACG GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 12)	GATATCCAGATGACACAGGCTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAG ACAGAGTCACCATCAGTTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTA AACTGGTATCAGCAGAACCCAGATGGAAGCTGTTAACTCCTGATCTACTA CACATCAAGATTACACTCAGGTGTCCCATCAAGGTTAGAGGCAGTGGG TCTGGGACAGATTTCTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATAT TGCCACTTATTTTTGCCAACAGGGTAAACGCTTCCTCGGACGCTCGGT GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

5 Ejemplo 2

(1) Preparación del anticuerpo anti-XCR1 humano quimérico y los anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados

- 10 Para producir el anticuerpo quimérico y los anticuerpos humanizados, se empleó 5G7, el cual presentó la actividad neutralizante más elevada entre 2H6, 5G7 y 11H2.

El anticuerpo quimérico se preparó combinando, mediante PCR de extensión por solapamiento, la secuencia genética de la región variable de la cadena pesada de 5G7 y la secuencia genética de la región constante de la IgG2 humana en la cual se había insertado la mutación V234A/G237A para la cadena pesada y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de 5G7 y la secuencia génica de la región constante de la Igk humana, e insertando la secuencia resultante en vectores de expresión (pEE6.4 o pEE12.4). Las Tablas 5 y 6, respectivamente, muestran las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos del anticuerpo quimérico específico.

20 Tabla 5

Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-XCR1 humano quimérico

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita y las CDR de la región variable están subrayadas)
Cadena pesada (SEQ ID NO: 13)	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSHNLHWVKQTPRQGLQWI GAIYPCNGNTAYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR WGSVVGDWYFDVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGT QTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena ligera (SEQ ID NO: 14)	DVVMQTPLSLPVTLGNQASIFCRSSLGLVHRNGNTYLHWYLRKPGQSPK LLIKVSHRFSGVPRDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSTHVPW TFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKLADYEKHKVYACEVT HQLSSPVTKSFNRGEC

25 Tabla 6

Secuencias de ácidos nucleicos del anticuerpo anti-XCR1 humano quimérico

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita)
Cadena pesada (SEQ ID NO: 15)	CAGGCTTATCTTCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGC CTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACCAAGTCA CAATTTGCACTGGGTAAAGCAGACACCTAGACAGGGCCTGCAATGGAT TGGAGCTATTTATCCAGGAAATGGTAATACTGCCTACAATCAGAAGTTC

	AAGGGCAAGGCCACGCTGACTGTAGACAAATCCTCCAGTACAGCCTA CATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTACTTCTG TGCAAGATGGGGTTCGGTTGTAGGAGACTGGTACTTTCGACGTCTGGGG CACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACCTCAGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGC TGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGT CGAGTGCCACCGTGCCAGCACACCTGCCGCAGCCCCGTGAGTCTT CCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGGTGACCGT CCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCA TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
Cadena ligera (SEQ ID NO: 16)	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTTGAA ATCAAGCCTCCATTTTTGTAGATCTAGTCTGGGCCTTGACACAGAAA TGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCC AAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCCACCGATTTCTGGGGTCCCAGA CAGGTTCAAGTGGCAGTGGCTCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAG CAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGGGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTAC CCATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

El anticuerpo se humanizó injertando la región determinante de la complementariedad del anticuerpo 5G7 de ratón en la región variable del anticuerpo humano. La región determinante de la complementariedad se determinó de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat y un método para identificar la región determinante de la complementariedad (por ejemplo, Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., NIH, EE. UU.). Además, las regiones determinantes de la complementariedad de 2H6 y 11H2 también se determinaron de manera similar. Las Tablas de 7-1 a 9-2 muestran las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos de las regiones determinantes de la complementariedad de estos tres clones.

Tabla 7-1

Secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de 5G7

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 17)	SHNLH
CDR 2 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 18)	AIYPGNGNTAYNQKFKG
CDR 3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 19)	WGSVVDWYFDV
CDR 1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 20)	RSSLGLVHRNGNTYLH
CDR 2 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 21)	KVSHRFS
CDR 3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 22)	SQSTHVPWT

Tabla 7-2

Secuencias de ácidos nucleicos de la región determinante de la complementariedad de 5G7

5

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 23)	AGTCACAATTTGCAC
CDR 2 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 24)	GCTATTTATCCAGGAAATGGTAATACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAG GGC
CDR 3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 25)	TGGGGTTCGGTTGTAGGAGACTGGTACTTCGACGTC
CDR 1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 26)	AGATCTAGTCTGGGCCTTGACACAGAAATGGAAACACCTATTTACAT
CDR 2 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 27)	AAAGTTTCCCACCGATTTTCT
CDR 3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 28)	TCTCAAAGTACCCATGTTCCGTGGACG

Tabla 8-1

Secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de 2H6

10

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 29)	SHNMH
CDR 2 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 30)	AIYPGKGNTSYNQKFKG
CDR 3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 31)	WGSVVDWYFDV
CDR 1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 32)	RSSQSLVHSNGNTYLH
CDR 2 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 33)	RVSNRFS
CDR 3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 34)	SQSTFVPWT

Tabla 8-2

Secuencias de ácidos nucleicos de la región determinante de la complementariedad de 2H6

15

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 35)	AGTCACAATATGCAC
CDR 2 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 36)	GCTATTTATCCAGGAAAAGGTAATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAG GGC
CDR 3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 37)	TGGGGTTCGGTAGTAGGAGACTGGTACTTCGATGTC
CDR 1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 38)	AGATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAT
CDR 2 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 39)	AGAGTTTCCAATCGATTTTCT
CDR 3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 40)	TCTCAAAGTACATTTGTTCCGTGGACG

Tabla 9-1

Secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de 11H2

20

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 41)	DYYVN
CDR 2 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 42)	VSNPKNGDKSYNQKFKG

CDR 3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 43)	GLYYAGTYGYFDV
CDR 1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 44)	RASQDISNYLN
CDR 2 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 45)	YTSRLHS
CDR 3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 46)	QQGKTLPR

Tabla 9-2

Secuencias de ácidos nucleicos de la región determinante de la complementariedad de 11H2

5

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 47)	GACTACTATGTGAAC
CDR 2 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 48)	GTTAGTAATCCTAAGAACGGTGATAAAAGTTACAACCAGAAAGTTCAAG GGC
CDR 3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 49)	GGGCTTTACTACGCTGGTACCTACGGGTACTTCGATGTC
CDR 1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 50)	AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAAC
CDR 2 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 51)	TACACATCAAGATTACACTCA
CDR 3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 52)	CAACAGGGTAAAACGCTTCCTCGGACG

Como resulta evidente a partir las Tablas de 7-1 a 8-1, la identidad de las secuencias de aminoácidos de las CDR entre 5G7 y 2H6 es elevada; en particular, las secuencias de aminoácidos de las CDR 3 de la cadena pesada fueron completamente idénticas. Por consiguiente, con relación a 5G7 y 2H6, las secuencias de aminoácidos se pueden generalizar según se muestra en la Tabla 10 a continuación. Adicionalmente, la Fig. 7 muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos de las CDR 1-3 de estos clones.

10

Tabla 10

15 Secuencias generalizadas de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad de 5G7 y 2H6

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 53)	SHNXH
CDR 2 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 54)	AIYPGXGNTXYNQKFKG
CDR 3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 55)	WGSVVGDWYFDV
CDR 1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 56)	RSSXXLVHXNGNTYLH
CDR 2 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 57)	XVSXRFS
CDR 3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 58)	SQSTXVPWT

La "X" en la tabla puede ser cualquiera de los siguientes: alanina (Ala: A), arginina (Arg: R), asparagina (Asn: N), ácido aspártico (Asp: D), cisteína (Cys: C), glutamina (Gln: Q), ácido glutámico (Glu: E), glicina (Gly: G), histidina (His: H), isoleucina (Ile: I), leucina (Leu: L), lisina (Lys: K), metionina (Met: M), fenilalanina (Phe: F), prolina (Pro: P), serina (Ser: S), treonina (Thr: T), triptófano (Trp: W), tirosina (Tyr: Y) y valina (Val: V).

20

Las FR de un anticuerpo humano con una identidad elevada respecto a la FR de 5G7 se seleccionaron como las FR de los anticuerpos humanizados. Posteriormente, los aminoácidos de las FR, que interaccionan con las CDR de 5G7, se predijeron empleando el modelo 3D del anticuerpo resultante y se injertaron con las CDR. La región constante de la IgG2 humana en la que se insertó la mutación V234A/G237A se empleó como la región constante. Se designaron HK1 y HK5 como las cadenas pesadas del anticuerpo humanizado, y se designaron L2 y L5 como las cadenas ligeras del anticuerpo humanizado. Las Tablas de 11-1 a 14-2 muestran las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos de los anticuerpos humanizados específicos.

25

30

Tabla 11-1

Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (HK1)

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita y las CDR de la región variable están <u>subrayadas</u>)
Cadena pesada (SEQ ID NO: 59)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHNLHWVRQAPGQRLEWM GAIPGNGNTAYNQKFKGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR WGSVVGDWYFDVWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFG TQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAAPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 60)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHNLHWVRQAPGQRLEWM GAIPGNGNTAYNQKFKGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR WGSVVGDWYFDVWGQGT LVTVSS

5 Tabla 11-2

Secuencias de ácidos nucleicos de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (HK1)

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita y las CDR de la región variable están <u>subrayadas</u>)
Cadena pesada (SEQ ID NO: 61)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCAGGGGC CTCTGTCAAGGTGAGTTGCAAGGCCTCCGGTTACACTTTACCT CCCCA CAACCTGCATTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGCGACTGGAGTGGA TGGGAGCAATCTACCCAGGCAACGGAAATACTGCCTATAATCAGAAGT TAAAGGCAGGGTGACAATTACTCGGGACACTTCCGCAAGCACCGCCT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGGAGTGAAGATACCGCTGTGTACTATT GTGCACGATGGGGATCCGTGGTCCGAGACTGGTATTTCGATGTGTGGG GGCAGGGTACCCTGGTCAAGTGTCTAGTGCCTCCACAAAGGGCCCCA GCGTGTTCCTACTGGCTCCCTGCTCTAGGAGTACATCAGAGTCCACTGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAACCAAGTCACCGTG AGTTGGAAGTCAAGGGGCTCTGACATCTGGTGTCCACACTTTTCCTGCAG TGCTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCCCTGAGCTCTGTGGTCACAGTCCC AAGTTCAAATTTCCGAACCCAGACATATACTTGCAACGTGGACCATAAGC CCAGCAATACCAAGGTGCGATAAAACAGTGGAGCGAAAGTGCTGTGTGCGA ATGCCCACCTTGTCAGCTCCACCAGCAGCAGCTCCTTCTGTGTTCCTG TTTCCTCCAAAGCCAAAGACACTCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGG TCACATGTGTGGTCTGTGACGTGTCTCACGAGGATCCTGAAGTCCAGTT TAACTGGTACGTGGATGGGGTCAAGTGCATAATGCAAAGACAAAACCA CGAGAGGAACAGTTCAACTCTACATTTCTGTCTGTGAGTGTGCTGACTG TCGTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTC CAATAAGGGGACTGCCCCCCCCTATCGAGAAAACCTATTAGCAAAGACAAA GGCCAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGTCGCGAG GAAATGACTAAGAACCAGGTCTCACTGACCTGTCTGGTGAAGGGTTCT ATCCCAGCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGTCAGCCTGAGAA CAATTACAAGACCACACCACCATGCTGGACTCCGATGGGAGCTTCTTT CTGTATTCAAAGCTGACCGTGGATAAATCCAGGTGGCAGCAGGGTAATG TCTTTAGCTGCTCTGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCATTAACCTCA GAAGTCCCTGTCCCTGTCACCTGGAAAGTGA
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 62)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCAGGGGC CTCTGTCAAGGTGAGTTGCAAGGCCTCCGGTTACACTTTACCT CCCCA CAACCTGCATTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGCGACTGGAGTGGA TGGGAGCAATCTACCCAGGCAACGGAAATACTGCCTATAATCAGAAGT TAAAGGCAGGGTGACAATTACTCGGGACACTTCCGCAAGCACCGCCT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGGAGTGAAGATACCGCTGTGTACTATT GTGCACGATGGGGATCCGTGGTCCGAGACTGGTATTTCGATGTGTGGG GGCAGGGTACCCTGGTCAAGTGTCTAGT

10 Tabla 12-1

Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (HK5)

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita y las CDR de la región variable están <u>subrayadas</u>)
Cadena pesada (SEQ ID NO: 63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHNLHWVRQAPGGGLEWM GAIPGNGNTAYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR WGSVVGDWYFDVWGQGLTVVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNF TQYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAAPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVSVLTVVHQDNLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 64)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHNLHWVRQAPGGGLEWM GAIPGNGNTAYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR WGSVVGDWYFDVWGQGLTVVSS

Tabla 12-2

Secuencias de ácidos nucleicos de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (HK5)

5

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita y las CDR de la región variable están <u>subrayadas</u>)
Cadena pesada (SEQ ID NO: 65)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCAGGGGC TTCTGTCAAGGTGAGTTGCAAAGCATCAGGTTACACTTTACCTCCCAC AACCTGCATTGGGTGCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTGGAGTGGAT GGGAGCAATCTACCCAGGGAACGGTAATACCGCTTATAATCAGAAGTT TAAAGGCAGGGTCACAATGACTCGGGACACCTCCACAAGCACTGTGT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGAAGTGAAGATACAGCAGTGTACTATT GTGCACGTTGGGGATCCGTGGTCCGTGACTGGTATTTCGATGTGTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACAGTGTCTAGT GCTTCCACTAAGGGGCCCA GCGTGTTCCTGCTGGCACCCTGCTCTCGGAGTACTTCAGAGTCCACCGC CGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAACCATCAGATG AGTTGGAAGTCAAGGCGCACTGACTTCTGGAGTCCACACCTTTCCTGCCG TGCTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCCCTGAGCTCTGTGGTCACTGTCCC AAGTTCAAATTTCCGAACCCAGACATATACTTGCAACGTGGACCATAAGC CCAGCAATACAAAGGTCGATAAACTGTGGAGAGAAAGTGTGTGTGGA ATGCCACCTTGTCCAGCACCACCAGCAGCAGCTCCTTCTGTGTTCCCTG TTTCTCCAAAGCCAAAAGACACACTGATGATCAGCCGCACACCCGAGG TCACTTGTGTGGTCTGTGGACGTGTCTCACGAGGATCCCTGAAGTCCAGTT TAACTGGTACGTGGATGGCGTCAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCA AGAGAGGAACAGTTCAACTCTACTTTTCGCGTCTGTGAGTGTGCTGACCG TCGTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCT CAATAAGGGACTGCCCGCTCCTATCGAGAAAACCATAGCAAGACAAAA GGACAGCCTAGGGAACCAAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGTCGGGAG GAAATGACCAAGAACCAGGTCTCACTGACATGTCTGGTGAAAGGGTTCT ATCCCAGCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGTCAGCCTGAGAA CAATTACAAGACCACACCACCATGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTT CTGTATTCAAAGCTGACCGTGGATAAATCCAGGTGGCAGCAGGGAAATG TCTTTAGCTGCTCTGTGATGCACGAAGCACTGCATAATCACTACACTCAG AAGAGCCTGTCCCTGTACCTGGTAAATGA
Región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 66)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCAGGGGC TTCTGTCAAGGTGAGTTGCAAAGCATCAGGTTACACTTTACCTCCCAC AACCTGCATTGGGTGCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTGGAGTGGAT GGGAGCAATCTACCCAGGGAACGGTAATACCGCTTATAATCAGAAGTT TAAAGGCAGGGTCACAATGACTCGGGACACCTCCACAAGCACTGTGT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGAAGTGAAGATACAGCAGTGTACTATT GTGCACGTTGGGGATCCGTGGTCCGTGACTGGTATTTCGATGTGTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACAGTGTCTAGT

Tabla 13-1

Secuencias de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L2)

10

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita y las CDR de la región variable están <u>subrayadas</u>)
Cadena ligera	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSLGLVHRNGNTYLHWFQQRPGQSP

(SEQ ID NO: 67)	RLLIYKVSHRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVP WTFGQGTKVEIK QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNREGC
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 68)	DVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSLGLVHRNGNTYLHWFQQRPGQSP RLLIYKVSHRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVP WTFGQGTKVEIK

Tabla 13-2

Secuencias de ácidos nucleicos de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L2)

5

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita y las CDR de la región variable están <u>subrayadas</u>)
Cadena ligera (SEQ ID NO: 69)	GATGTCGTGATGACCCAGTCTCCTCTGAGCCTGCCTGTGACTCTGGGC CAGCCAGCATCAATCTCCTGCCGATCCAGCCTGGGACTGGTGCACCGT AACGGGAATACCTACCTGCATTGGTTCCAGCAGAGGCCTGGTCAGAGT CCCCGGCTGCTGATCTATAAGGTGTCTCACAGATTCAGTGGCGTCCCA GACCGCTTTAGCGGCTCTGGAAGTGGGACTGATTTACCCTGAAAATT TCCCGAGTGGAGGCAGAAGACGTGGGAGTCTACTATTGCTCACAGTCC ACACATGTGCCCTGGACTTTTGGTCAGGGCACCAAGGTCGAGATCAAA CGCACCCTGGCCGCTCCTAGCGTCTTCATTTTCCCCCTTCTGACGAAC AGCTGAAGTCAGGAACAGCTTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTA CCCCAGAGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGAG CGGCAACTCCCAGGAGAGTGTGACAGAACAGGACTCAAAGGATTCCAC TTATAGCCTGTCTAGTACCCTGACACTGTCTAAAGCTGATTACGAGAAGC ACAAAGTGTATGCATGTGAAGTCACCCACCAGGGGCTGTCATACCCGT CACCAAGTCCTTAATAGAGGGGAGTGTTGA
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 70)	GATGTCGTGATGACCCAGTCTCCTCTGAGCCTGCCTGTGACTCTGGGC CAGCCAGCATCAATCTCCTGCCGATCCAGCCTGGGACTGGTGCACCGT AACGGGAATACCTACCTGCATTGGTTCCAGCAGAGGCCTGGTCAGAGT CCCCGGCTGCTGATCTATAAGGTGTCTCACAGATTCAGTGGCGTCCCA GACCGCTTTAGCGGCTCTGGAAGTGGGACTGATTTACCCTGAAAATT TCCCGAGTGGAGGCAGAAGACGTGGGAGTCTACTATTGCTCACAGTCC ACACATGTGCCCTGGACTTTTGGTCAGGGCACCAAGGTCGAGATCAAA

Tabla 14-1

Secuencias de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L5)

10

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita y las CDR de la región variable están <u>subrayadas</u>)
Cadena ligera (SEQ ID NO: 71)	DIVMTQTPLSLPVTGQPASISCRSSLGLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPQ LLIYKVSHRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPW TFGQGTKVEIK WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNREGC
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 72)	DIVMTQTPLSLPVTGQPASISCRSSLGLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPQ LLIYKVSHRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPW TFGQGTKVEIK

Tabla 14-2

Secuencias de ácidos nucleicos de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L5)

15

Nombre	Secuencia (la región variable se indica en negrita y las CDR de la región variable están <u>subrayadas</u>)
Cadena ligera (SEQ ID NO: 73)	GATATTGTGATGACTCAGACTCCACTGAGCCTGCCAGTGAATCCCGGC CAGCCTGCATCAATCTCCTGCAGATCCAGCCTGGGACTGGTGCACCGC AACGGGAATACCTACCTGCATTGGTATCTGCAGAAGCCTGGTCAGAGT CCCCAGCTGTGATCTACAAGGTGTCTCACAGGTTCACTGGCGTCCCC GACCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGTGGGACTGATTTACCCTGAAGATT TCCCGAGTGGAGGCCGAAGACGTGGGCGTCTACTATTGCTCACAGTCC ACACATGTGCCCTGGACTTTTGGTCAGGGCACCAAGGTCGAGATCAAA AGGACCGTGGCCGCTCCAAGCGTCTTCATTTTCCCCCTTCTGACGAAC

	AGCTGAAGTCAGGAACAGCTTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTA CCCCAGAGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAGTCGATAACGCCCTGCAGAG CGGCAACTCCCAGGAGAGTGTGACAGAACAGGACTCAAAGGATTCCAC TTATAGCCTGTCTAGTACCCTGACACTGTCTAAAGCTGATTACGAGAAGC ACAAAGTGTATGCATGTGAAGTCACACACCAGGGTCTGAGTTCCCCCGT CACCAAATCCTTTAATCGTGGAGAGTGCTGA
Región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 74)	GATATTGTGATGACTCAGACTCCACTGAGCCTGCCAGTGACTCCCGGC CAGCCTGCATCAATCTCCTGCAGATCCAGCCTGGGACTGGTGCACCGC AACGGGAATACCTACCTGCATTGGTATCTGCAGAAGCCTGGTCAGAGT CCCCAGCTGCTGATCTACAAGTGTCTCACAGGTTCACTGGCGTCCCC GACCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGTGGGACTGATTTACCCTGAAGATT TCCCGAGTGGAGGCCGAAGACGTGGGCGTCTACTATTGCTCACAGTCC ACACATGTGCCTTGGACTTTTGGTCAGGGCACCAAGGTCGAGATCAA

Las secuencias genéticas de estos anticuerpos humanizados fueron sintetizadas en su totalidad por GenScript USA Inc. y se insertaron en vectores de expresión (pEE6.4 o pEE12.4, que se adquirieron de Lonza). Para producir los anticuerpos, los vectores de expresión se transfectaron en células HEK293E (Invitrogen) empleando Lipofectamine 2000, de acuerdo con las instrucciones para Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se recogieron los sobrenadantes y se purificaron empleando proteína A (GE Healthcare). Se evaluó la actividad neutralizante empleando estos anticuerpos humanizados purificados.

Los anticuerpos humanizados con actividad neutralizante contra la migración inducida por linfotactina humana de células que expresan XCR1 humano se identificaron llevando a cabo ensayos de quimiotaxis in vitro empleando células B300.19 que expresan XCR1 humano. El ensayo de quimiotaxis se llevó a cabo según se ha descrito previamente empleando placas de cultivo Transwell de 96 pocillos (MultiScreen, poro de 5 µm, Millipore, #MAMIC 5S10, o Corning #3387 o #3388). Sin embargo, en el caso de utilizar placas de cultivo Transwell de Corning, la cantidad de linfotactina humana recombinante y de anticuerpos purificados que se debe añadir a los pocillos inferiores es de 235 µL por pocillo.

Entre los anticuerpos humanizados con actividad neutralizante, dos tipos de los siguientes anticuerpos, HK1L2 y HK5L5, se evaluaron con más detalle.

(2) Reactividad de los anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados (HK1L2 y HK5L5) frente a células que expresan XCR1 humano

Se realizó un análisis por FACS empleando estos dos anticuerpos humanizados (HK1L2 y HK5L5), el anticuerpo 5G7 parental y el anticuerpo quimérico. Las células B300.19 parentales y las células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano se mezclaron con una proporción 1:1 y se suspendieron en un tampón FACS (PBS- que contenía un 1% de FBS (Sigma)). Las células se incubaron durante 20 minutos en hielo con los anticuerpos purificados con varias concentraciones, desde 0 hasta 10 µg/mL. Las células se lavaron tres veces con el tampón FACS y a continuación se incubaron durante 20 minutos en hielo con el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con PE (Jackson, #715-116-151: empleado para células que habían sido teñidas con el anticuerpo 5G7 parental, con un factor de dilución 1:100 en el tampón FACS) o con el anticuerpo policlonal anti-IgG humana marcado con PE (Jackson, #709-116-149: empleado para células que habían sido teñidas con el anticuerpo quimérico o los anticuerpos humanizados (HK1L2 y HK5L5), con un factor de dilución 1:100 en tampón FACS). Las células se lavaron tres veces con tampón FACS y a continuación se suspendieron en tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia empleando un analizador celular FACSCanto II (BD Bioscience).

Los anticuerpos humanizados (HK1L2 y HK5L5) presentaron una reactividad dependiente de la concentración frente a las células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano. El anticuerpo 5G7 parental y el anticuerpo quimérico presentaron sustancialmente la misma actividad (Fig. 3).

La reactividad de los anticuerpos humanizados (HK1L2 y HK5L5) frente al XCR1 humano se examinó adicionalmente mediante análisis por FACS empleando células mononucleares de sangre periférica humana. Debido a que existe constancia de que el gen XCR1 humano se expresa en células dendríticas BDCA3+, las cuales representan una población minoritaria de las células mononucleares de la sangre periférica humana, en primer lugar las células dendríticas se concentraron a partir de las células mononucleares de sangre periférica humana y se emplearon para el análisis por FACS. Las células mononucleares de sangre periférica humana se aislaron de la sangre de sujetos humanos sanos empleando Ficoll-Paque (GE Healthcare, #17-1440-02). Las células positivas para CD3, CD14, CD19 y CD56 de las células mononucleares de sangre periférica humana se marcaron con microesferas de anticuerpos CD3, CD14, CD19 y CD56 (Miltenyi, #130-050-101, #130-050-201, #130-050-301, #130-050-401) y se eliminaron empleando un auto-MACS (Miltenyi). De este modo, se concentraron las células dendríticas humanas. Las células dendríticas concentradas se bloquearon durante 10 minutos en hielo con un tampón FACS (PBS- que contenía un 1% de FBS (Sigma)) que contenía un 1% de suero de rata, un 1% de suero de ratón y 100 µg/mL de inmunoglobulina humana. A continuación, las células se tiñeron durante 30 minutos en hielo separadamente empleando 5G7, HK1L2 y HK5L5 marcados con PE, e IgG2b, κ de ratón como anticuerpo de

control de isotipo (eBioscience, #14-4732-82) o IgG2, κ humana (Sigma, #I5404) con anticuerpo anti-BDCA3 marcado con FITC (Miltenyi, #130-090-513), anticuerpo anti-CD123 marcado con APC (Miltenyi, #130-090-901), anticuerpo anti-HLA-DR marcado con APC-Cy7 (BioLegend, #307617) y anticuerpos anti-CD3, CD14, CD19, CD56 marcados con Alexa700 (BioLegend, #300324, #301822, #302225 y #318316). Las células se lavaron tres veces con el tampón FACS y a continuación se suspendieron en el tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia empleando un analizador celular FACSCanto II.

Del mismo modo que en el caso del anticuerpo 5G7 parental, los anticuerpos humanizados (HK1L2 y HK5L5) reaccionaron selectivamente frente a las células dendríticas BDCA3+ que expresan XCR1 humano (Fig. 4).

(3) Actividad neutralizante de los anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados (HK1L2 y HK5L5) sobre la migración inducida por linfotactina humana de células que expresan XCR1 humano

La actividad neutralizante de estos anticuerpos humanizados se evaluó en paralelo con el anticuerpo 5G7 parental y un anticuerpo quimérico mediante un ensayo de quimiotaxis in vitro, según se ha descrito previamente.

En comparación con el anticuerpo 5G7 parental, ambos anticuerpos humanizados conservaron la actividad neutralizante. La Fig. 5 muestra el patrón característico de inhibición dependiente de la concentración. Los valores de CI_{50} y CI_{90} se calcularon a partir de tres experimentos independientes. La Tabla 16 muestra estos valores como la media $\pm$ error estándar.

Tabla 16

Actividad neutralizante de los anticuerpos humanizados (HK1L2 y HK5L5) en el ensayo de quimiotaxis

	mAb de ratón	mAb quimérico
	Media $\pm$ E.E.	Media $\pm$ E.E.
CI_{50} (nM)	0.23 ± 0.120	0.27 ± 0.101
CI_{90} (nM)	1.31 ± 0.452	1.52 ± 0.755

HK1L2				
	Ensayo-1	-2	-3	Media $\pm$ E.E.
CI_{50} (nM)	0.10	0.25	0.12	0.16 ± 0.081
CI_{90} (nM)	0.66	1.01	0.92	0.86 ± 0.182
HK5L5				
	Ensayo-1	-2	-3	Media $\pm$ E.E.
CI_{50} (nM)	0.52	0.36	0.20	0.36 ± 0.160
CI_{90} (nM)	2.30	3.15	1.70	2.38 ± 0.729

A continuación, la actividad neutralizante de los anticuerpos humanizados (HK1L2 y HK5L5) se examinó adicionalmente mediante un ensayo de migración transendotelial que empleó células dendríticas humanas en lugar de células que expresan XCR1 humano. El ensayo de migración transendotelial se llevó a cabo empleando soportes de cultivo Transwell de 24 pocillos (poro de 5 μ m, Costar, #3421). En primer lugar, se suspendieron células ECV304 en medio 199 con medio de Earle que contenía un 10% de FBS (Invitrogen) y se sembraron 2×10^5 de estas células por pocillo en la cámara superior del Transwell, a continuación se incubaron en una incubadora con un 5% de CO_2 a 37 °C durante 3 días. El día del ensayo, las células ECV304 se lavaron con tampón de ensayo (una mezcla de medio 199 con medio de Earle, y medio RPMI 1640 con una proporción de 1:1, a la cual se añadió un 0.5% de BSA y HEPES 20 mM (pH de 7.4)). La linfotactina humana recombinante disuelta en el tampón de ensayo con una concentración de 1 μ g/mL, a la cual se había añadido el anticuerpo quimérico, HK1L2, HK5L5 o IgG2, κ humana como anticuerpo de control de isotipo (Sigma) con una concentración de 10 μ g/mL, se añadió a los pocillos inferiores en una cantidad de 600 μ L/pocillo. Las células dendríticas humanas se concentraron según se ha descrito previamente, se suspendieron en el tampón de ensayo, al cual se habían añadido el anticuerpo quimérico, los anticuerpos humanizados (HK1L2 y HK5L5) y la IgG2, κ humana como anticuerpo de control de isotipo (Sigma) con una concentración de 10 μ g/mL, y se añadieron a los pocillos superiores que contenían las células ECV304. Después de 4 horas de incubación en una incubadora con un 5% de CO_2 a 37 °C, las células del Transwell se centrifugaron a 1350 rpm durante 5 minutos y se recogieron las células que migraron. Las células recogidas se tiñieron durante 30 minutos en hielo empleando marcadores de linaje celular, anticuerpo anti-BDCA3 marcado con FITC (Miltenyi, #130-090-513), anticuerpo anti-BDCA1 marcado con PE (BioLegend, #331517), anticuerpo anti-CD123 marcado con APC (Miltenyi, #130-090-901) y anticuerpo anti-HLA-DR marcado con APC (BioLegend, #307617). A continuación, se aplicaron 170 μ L de cada muestra al analizador celular FACSCanto II (BD Bioscience) para contar el número de células.

Ambos anticuerpos humanizados inhibieron la migración de las células dendríticas BDCA3+, como en el caso del anticuerpo quimérico (Fig. 6).

Ejemplo 3**Efecto farmacológico del anticuerpo anti-XCR1 producido en ratón**

- 5 El efecto farmacológico del anticuerpo monoclonal anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7) preparado en el Ejemplo 2 anterior se confirmó empleando un modelo en ratones de dermatitis por contacto retardada (DCR).

(1) Efecto del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón sobre la inflamación auricular provocada por DNFB (dinitrofluorobenceno)-Ratones sensibilizados**Método experimental****1. Muestras de ratones**

- 15 Para el experimento, se emplearon ratones que incorporan XCR1 humano (ratones cuyo gen XCR1 se ha reemplazado por el gen XCR1 humano) de procedencia C57BL/6, con edades comprendidas entre 7 semanas y 12 semanas.

2. Método de preparación de DNFB para la sensibilización y DNFB para la inducción

- 20 El DNFB para la sensibilización y la inducción se preparó mezclando DNFB en una mezcla de acetona y aceite de oliva 4:1 para obtener una concentración de un 0.5%. Además, se empleó una mezcla de acetona y aceite de oliva 4:1 como solución de control para la inducción.

3. Método de administración de DNFB

- 25 Se afeitó el pelo abdominal de los ratones para exponer la piel, y se les aplicaron 50 µL de DNFB al 0.5% para la sensibilización. Al día siguiente, se volvieron a aplicar 50 µL de DNFB al 0.5% en el mismo sitio. 4 días después de la aplicación, se aplicaron 25 µL de DNFB al 0.5% para la inducción en la cara frontal de la oreja derecha de los ratones. Al mismo tiempo, a modo de control, se aplicaron 25 µL de la solución de control, obtenida mezclando acetona y aceite de oliva con una proporción de 4:1, en la cara frontal de la oreja izquierda de los ratones.

4. Método de administración de los anticuerpos

- 35 El anticuerpo anti-XCR1 humano monoclonal producido en ratón (5G7) y su anticuerpo de control, es decir, la IgG de ratón (Jackson Laboratory), se prepararon en PBS para obtener una concentración final de 2 mg/mL. El día que se llevó a cabo la primera sensibilización se definió como Día 0. Cada uno de los anticuerpos anteriores se administró por vía intraperitoneal a los ratones en una cantidad de 250 µL/ratón (500 µg/ratón) en el Día -1, el Día 1 y el Día 4.

5. Método para evaluar la inflamación auricular del modelo de ratones sensibilizados con DNFB

- 40 El primer día y el día siguiente, los ratones se sensibilizaron aplicando 50 µL de DNFB al 0.5% en la piel expuesta del abdomen. 4 días después de la sensibilización, se midió el grosor de la oreja empleando un calibre. Después de la medición, se aplicaron 25 µL de DNFB al 0.5% en la cara frontal de la oreja derecha de los ratones para la inducción. Además, a modo de control, se aplicaron 25 µL de la solución de control, obtenida mezclando acetona y aceite de oliva con una proporción de 4:1, en la oreja izquierda de los ratones. Se midió el grosor de la oreja 24 horas y 48 horas después de la inducción. La inflamación se determinó convirtiendo los valores medidos con la siguiente fórmula.

Fórmula

Grosor de la oreja modificado por el DNFB (inflamación: mm) = ([A] - [B]) - ([C] - [D])

[A]: grosor de la oreja derecha después de la inducción (mm)

[B]: grosor de la oreja derecha antes de la inducción (mm)

[C]: grosor de la oreja izquierda después de aplicar la solución de control (mm)

[D]: grosor de la oreja izquierda antes de aplicar la solución de control (mm)

Resultados experimentales y análisis

La Fig. 8 muestra claramente una supresión significativa de la inflamación auricular 24 h después de la inducción con DNFB en los ratones a los que se administró el anticuerpo anti-XCR1 humano monoclonal producido en ratón

(5G7), en comparación con los ratones a los que se administró el anticuerpo de control (Fig. 8A). El efecto también presentó una supresión significativa en una forma similar 48 horas después de la inducción con DNFB (Fig. 8B).

Aunque el anticuerpo se administró sistémicamente por vía intraperitoneal, se suprimió la inflamación en la oreja inducida con DNFB. Por consiguiente, se supone que el anticuerpo se transfirió desde la cavidad abdominal hacia la sangre y, junto con el torrente sanguíneo, alcanzó el punto de inflamación o el ganglio linfático, donde el anticuerpo presenta el efecto de suprimir la inflamación auricular.

Esto sugiere que los anticuerpos de la presente invención ejercen un efecto específico en el punto de inflamación de una forma específica a dicho punto.

Ejemplo 4

Reactividad del anticuerpo anti-XCR1 humano monoclonal producido en ratón (5G7) frente a varios receptores de quimiocinas humanas

Se evaluó la reactividad del anticuerpo anti-XCR1 humano monoclonal producido en ratón (5G7) frente a varios receptores de quimiocinas humanas mediante análisis por FACS. Las células B300.19 parentales y células B300.19 que expresan receptores (CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR11, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, o XCR1) unidos a EGFP se suspendieron en un tampón FACS (PBS- (Sigma) que contenía un 1% de FBS). Las células se bloquearon durante 20 minutos en hielo con un tampón de bloqueo (un tampón FACS que contenía 100 µg/mL de inmunoglobulina humana). A continuación, las células se incubaron durante 30 minutos en hielo con el tampón de bloqueo que contenía 5G7 o anticuerpo de control de isotipo de ratón IgG2b (eBioscience, #14-4732-82) con una concentración de 10 µg/mL. Las células se lavaron tres veces con el tampón FACS y a continuación se incubaron durante 20 minutos en hielo con el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con PE (Jackson, #715-116-151, con un factor de dilución de 1:50 en el tampón de bloqueo). Las células se lavaron con el tampón FACS tres veces y a continuación se suspendieron en el tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia empleando un analizador celular FACSCanto II.

El anticuerpo anti-XCR1 humano 5G7 presentó una reactividad elevada frente a las células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano. Además, el anticuerpo anti-XCR1 humano 5G7 presentó una reactividad muy baja frente a las células B300.19 que expresan EGFP-CX3CR1 humano y no presentó ninguna reactividad frente a células B300.19 que expresan otros receptores de quimiocinas humanas unidos a EGFP (Fig. 9). Por otro lado, el anticuerpo de control de isotipo de ratón no presentó ninguna reactividad frente a células B300.19.

Ejemplo 5

Citotoxicidad de anticuerpos anti-XCR1 humano, empleando el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón con Fab conjugado a saporina, frente a células que expresan XCR1 humano

Con el fin de demostrar la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-XCR1 humano frente a células que expresan XCR1, se examinó la citotoxicidad de mAbs anti-XCR1 humano producidos en ratón frente a células en las que el XCR1 humano se expresa de forma exógena, empleando el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón con Fab conjugado a saporina.

En cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se añadieron 2 x 10³ células de células B300.19 parentales o células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano en 80 µl de RPMI1640 (Invitrogen, #11875-093) que contenía un 10% de suero bovino fetal (Cell Culture Bioscience, #171012), 100 µg/ml de sulfato de kanamicina (Invitrogen, #15160-054) y 2-mercaptoetanol 50 µM (2-ME, Invitrogen, #21985-023). Los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 o 11H2), anticuerpos de control de isotipo de ratón, IgG2a, κ (eBioscience, #16-4724-85) o IgG2b, κ (eBioscience, #16-4732-85) se diluyeron con RPMI1640 que contenía un 10% de suero bovino fetal, 100 µg/ml de sulfato de kanamicina y 2-ME 50 µM, y se añadieron 10 µl de los anticuerpos diluidos a las células con varias concentraciones, desde 0 hasta 0.17 µg/ml. A continuación, las células se incubaron en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C durante 20 min. A continuación, el anticuerpo anti-IgG de ratón con Fab conjugado a saporina (Advanced Targeting Systems, #IT-48) se diluyó hasta 10 µg/ml con RPMI1640 que contenía un 10% de suero bovino fetal, 100 µg/ml de sulfato de kanamicina y 2-ME 50 µM, y se añadieron 10 µl del anticuerpo anti-IgG de ratón con Fab conjugado a saporina diluido a cada pocillo con la concentración final de 1 µg/ml. A continuación, las células se incubaron en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C durante 72 h. A continuación, se determinó el número de células en cada pocillo empleando un reactivo de recuento celular SF (Nacalai tesque, 07553-15 o -44). Se añadió el reactivo a cada pocillo y las células se incubaron en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C durante 2 o 3 h. A continuación, se determinó el DO450 con un lector de placas (Arvo, PerkinElmer).

Los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) con anticuerpo secundario conjugado a saporina presentaron una supresión del crecimiento de las células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano (Fig. 11). Los valores de CI₅₀ de 2H6, 5G7 y 11H2 calculados con el software Graphpad Prism fueron de 0.141 nM, 0.017 nM y 0.155 nM, respectivamente. Por otro lado, estos anticuerpos con anticuerpo secundario conjugado a saporina

no presentaron supresión del crecimiento de las células B300.19 parentales. Los anticuerpos de control con anticuerpo secundario conjugado a saporina no suprimieron el crecimiento celular de las células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano ni de las células B300.19 parentales (Fig. 11). Estos descubrimientos indican que los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón, 2H6, 5G7 y 11H2, se interiorizaron con el anticuerpo secundario conjugado a saporina y actuaron como una inmunotoxina.

Ejemplo 6

Efectos de Mab 5G7 sobre el ensayo de linfocitos T citotóxicos in vivo

Para investigar la actividad inhibitoria de Mab 5G7 sobre la función de LTC, se llevó a cabo un ensayo de LTC.

Los ratones que han sido sometidos a técnicas de ingeniería genética para la inserción de secuencias génicas de XCR1h, en los que se expresa el XCR1 humano en vez del XCR1 de ratón, se inmunizaron subcutáneamente con ovoalbúmina (200 µg/cabeza) emulsionada con CFA el Día 0. El Mab 5G7 o la IgG de ratón de control (Jackson Laboratory) se inyectaron por vía intraperitoneal en una dosis de 500 µg/cabeza el Día -1, el Día 2 y el Día 5. Seis días después, se incubaron esplenocitos de ratones C57BL/6 que no habían sido sometidos a ningún tratamiento previo durante 30 min a 37 °C con o sin 10 µg/ml del péptido OVA257-264 (SIINFEKL; MBL).

Estas poblaciones de células diana y no diana incubadas con péptido se marcaron con CFSE 2.5 y 0.25 µM (Invitrogen Life Technologies), respectivamente, a continuación se mezclaron en una proporción de 1:1 y se inyectaron por vía intravenosa en los ratones inmunizados.

Un día después de la inyección de los esplenocitos marcados con CFSE, se evaluó la actividad citolítica utilizando la proporción de poblaciones positivas para CFSE en el bazo como se indica a continuación.

Las células positivas para CFSE en el bazo de los ratones inmunizados se detectaron mediante citometría de flujo, y la actividad de LTC de cada ratón se calculó con la proporción de células con CFSEalto y células con CFSEbajo como se indica a continuación: actividad de LTC = (% de CFSEalto/% de CFSEbajo).

Posteriormente, la actividad de LTC relativa se calculó como se indica a continuación:

Actividad de LTC relativa = (actividad de LTC en cada ratón inmunizado)/ (actividad de LTC en ratón de control).

Los resultados mostraron que la actividad de LTC relativa en los ratones tratados con el Mab 5G7 mostraron una menor actividad de LTC relativa en comparación con la de los ratones tratados con la IgG de control (Fig. 12).

Los datos indicaron la supresión de la actividad de LTC in vivo mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-XCR1, y sugirieron que el tratamiento con anticuerpos anti-XCR1 puede ser beneficioso para enfermedades inmunitarias, tales como el rechazo de injerto, EICH y lesiones tisulares en enfermedades autoinmunitarias.

Ejemplo 7

Reactividad de anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) respecto a las células que expresan XCR1 humano/de ratón quimérico

Para determinar los epítomos del XCR1 humano que son reconocidos por los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7, and 11H2), se evaluó la reactividad de estos anticuerpos respecto a células que expresan XCR1 humano/de ratón quimérico.

Debido a que los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) reaccionaban frente al XCR1 humano pero no frente al XCR1 de ratón, se preparó un panel de receptores XCR1 humanos/de ratón quiméricos. En este panel, cada dominio extracelular de XCR1 humano se reemplazó con la región homóloga de XCR1 de ratón y viceversa. Los vectores de expresión de este panel se construyeron utilizando un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extensión por solapamiento. Cada receptor quimérico unido a EGFP se expresó en células TK-1 y la reactividad del mAb se determinó mediante un análisis por FACS. Las células TK-1 parentales, las células TK-1 que expresan EGFP-XCR1 humano, EGFP-XCR1 de ratón o EGFP-XCR1 quimérico se suspendieron en un tampón FACS (PBS- (Sigma) que contenía un 1% de suero bovino fetal). Las células se bloquearon durante 10 minutos en hielo con un tampón FACS que contenía 100 µg/mL de inmunoglobulina humana. A continuación, las células se incubaron durante 20 minutos en hielo con los anticuerpos anti-XCR1 humano (2H6, 5G7 o 11H2) con concentraciones diferentes comprendidas entre 0 y 10 µg/mL, anticuerpos de control de isotipo de ratón, IgG2a (eBioscience, #14-4724-82) o IgG2b (eBioscience, #14-4732-82), con una concentración de 10 µg/mL, o un tampón FACS sin anticuerpo. Las células se lavaron con el tampón FACS tres veces y después se incubaron durante 20 minutos en hielo con el anticuerpo anti-IgG de ratón policlonal marcado con PE (Jackson, #715-116-151, con un factor de dilución de 1:50 en el tampón FACS) o anticuerpo anti-XCR1 humano policlonal marcado con PE (R&D, #FAB857P, con un factor de dilución de 2:5 en el tampón FACS, empleado para las células que habían sido

incubadas con el tampón FACS sin anticuerpo). Las células se lavaron con tampón FACS tres veces y a continuación se suspendieron en tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia con un analizador celular FACSCanto II.

Los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) mostraron reactividad frente a células TK-1 que expresan EGFP-XCR1 humano, pero no frente a células TK-1 parentales o células TK-1 que expresan EGFP-XCR1 de ratón (Fig. 13; los orígenes de los cuatro dominios extracelulares se designaron con códigos de cuatro letras (p. ej., HHHH es XCR1 humano natural, Hmmm tiene un dominio extracelular N-terminal humano, y el primero, segundo y tercer bucle extracelular de ratón, etc.)). Estos tres anticuerpos mostraron reactividad frente a las células TK-1 que expresan EGFP-XCR1 quiméricos, que contienen el extremo N-terminal de XCR1 humano. La reactividad frente al receptor quimérico, mmHm, también se examinó en otro experimento y no se observó reactividad (no se muestran los datos).

Por el contrario, los anticuerpos de control de isotipo de ratón no mostraron reactividad frente a ninguna de las células TK-1 (no se muestran los datos).

Ejemplo 8

Mapeo de los sitios de unión de anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) en los dominios extracelulares de XCR1 humano mediante ELISA peptídico

Para definir los residuos de contacto de los anticuerpos anti-XCR1 humano (2H6, 5G7 y 11H2) en dominios extracelulares de XCR1, se llevó a cabo un análisis de barrido peptídico utilizando grupos de péptidos 12-mer que abarcaba los dominios extracelulares del XCR1 humano.

Sigma sintetizó dos grupos de péptidos con biotina y el espaciador GSGS en el extremo N-terminal. El primer grupo de 13 péptidos contenía todos los mer-12 posibles del extremo N terminal del XCR1 humano, cada uno separado por 2 aminoácidos. El Segundo grupo de 13 péptidos contenía todos los 12-mer posibles de los bucles extracelulares del XCR1 humano, cada uno separado por 3 aminoácidos. Los péptidos se reconstituyeron inicialmente en un 100% de sulfóxido de dimetilo y posteriormente se diluyeron en una solución al 30% de sulfóxido de dimetilo para obtener una concentración final de 50 µg/mL para el ELISA directo.

Se llenaron placas de microvaloración recubiertas de estreptavidina (Perkin Elmer) con 50 µg/mL de péptido por pocillo en un volumen de 50 µL y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se retiró la solución peptídica y se añadió PBS- que contenía un 4% de Block-Ace a cada pocillo y se incubó durante la noche a 4 °C. Cada pocillo se lavó tres veces con tampón de lavado ELISA (Tween20 al 0.02% en PBS-). Se añadieron 10 µg/mL de anticuerpos anti-XCR1 humano (2H6, 5G7 o 11H2) a cada pocillo y se incubaron durante 6 horas a temperatura ambiente. Cada pocillo se lavó tres veces con el tampón de lavado ELISA. Se añadió peroxidasa de rábano conjugada con anticuerpo anti-IgG de ratón producido en asno (Jackson, #715-035-150), con un factor de dilución de 1:5000 en el tampón de lavado ELISA, a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Cada pocillo se lavó tres veces con el tampón de lavado ELISA. Se añadió TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; Sigma) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 N y se midió A_{450nm} con un lector de placas Arvo (PerkinElmer).

Los anticuerpos anti-XCR1 humano 2H6 y 5G7 mostraron una unión fuerte a un péptido que contenía 7PESTTFFYYDLQ18 (SEQ ID NO: 96) y una unión débil a 11TFFYYDLQSQPC22 (SEQ ID NO: 110) (Fig. 14). 5G7 también mostró una unión débil a tres péptidos no secuenciales que contenían 19SQPCENQAWVFA30 (SEQ ID NO: 101), 172SSGCDYSELTWY183 (SEQ ID NO: 110) y 175CDYSELTWYLT186 (SEQ ID NO: 111). Por el contrario, 11H2 no muestra reactividad frente a estos péptidos (no se muestran los datos).

Ejemplo 9

Mapeo de residuos de unión de anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) y anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados (HK1L2 y HK5L5) en dominios extracelulares de XCR1 humano utilizando mutantes de alanina

Para determinar los residuos críticos del XCR1 humano que son reconocidos por los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) y los anticuerpos anti-XCR1 humanizados (HK1L2 y HK5L5), se llevó a cabo un ensayo de sustitución de alanina.

Se preparó un panel de mutantes de sustitución por alanina del XCR1 humano. En este panel, cada aminoácido en 7PESTTFFYYDLQSQPCENQAWVFA30 (SEQ ID NO: 118) y 175CDYSELTWYLT186 (SEQ ID NO: 119) de las regiones extracelulares de XCR1 se reemplazó por alanina. Los vectores de expresión de mutantes de sustitución por alanina se construyeron utilizando mutagénesis dirigida. Cada mutante se expresó en células B300.19 y la reactividad de los anticuerpos se determinó mediante un análisis por FACS. Las células B300.19 parentales y las células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano o que expresan cada mutante de alanina de XCR1 unido a

EGFP se mezclaron con una proporción de 1:1 y se suspendieron en tampón FACS (PBS- (Sigma) que contenía un 1% de suero fetal bovino). Las células se bloquearon durante 10 minutos en hielo con un tampón FACS que contenía un 10% de suero de rata. A continuación, las células se incubaron durante 20 minutos en hielo con anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 o 11H2), anticuerpos humanizados (HK1L2 o HK5L5), anticuerpos de control de isotipo de ratón, IgG2a (eBioscience, #14-4724-82) o IgG2b (eBioscience, #14-4732-82), o anticuerpo IgG2 de control de isotipo humano (Sigma, #I5404), en una concentración de 10 µg/mL; o se incubaron con tampón FACS sin anticuerpo. Las células se lavaron tres veces con el tampón FACS y a continuación se incubaron durante 20 minutos en hielo con anticuerpo anti-IgG de ratón policlonal marcado con PE (Jackson, #715-116-151, con un factor de dilución de 1:50 en el tampón FACS, empleado para células que habían sido incubadas con anticuerpos de ratón), anticuerpo anti-IgG humano policlonal marcado con PE (Jackson, #709-116-149, con un factor de dilución de 1:50 en el tampón FACS, empleado para células que habían sido incubadas con anticuerpos humanizados o IgG de control humano) o anticuerpo anti-XCR1 humano policlonal marcado con PE (R&D, #FAB857P, con un factor de dilución de 2:5 en el tampón FACS, empleado para células que habían sido incubadas con el tampón FACS sin anticuerpo). Las células se lavaron tres veces con el tampón FACS y a continuación se suspendieron en el tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un analizador celular FACSCanto II (BD Bioscience).

Cada mutante de alanina se detectó con el anticuerpo anti-XCR1 humano policlonal marcado con PE, salvo el mutante C175A (Fig. 15). Debido a que las cantidades de expresión de cada mutante de alanina sobre la superficie celular variaban entre estos mutantes, como se muestra en la Fig. 15, la reactividad de los anticuerpos frente a cada mutante de alanina se evaluó utilizando un valor medio de PE relativo (mAb/pAb), calculado mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se calculó un valor medio de PE relativo para cada anticuerpo fijando el valor medio de PE, que se obtuvo mediante la tinción de células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 (naturales) utilizando cada anticuerpo, como 1.0. A continuación, los valores medios de PE relativos (mAb/pAb) se calcularon mediante la siguiente ecuación: cada valor medio de PE relativo para los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 u 11H2) o anticuerpos humanizados (HK1L2 o HK5L5) se dividió por los valores medios de PE relativos para el anticuerpo anti-XCR1 humano policlonal marcado con PE. Los resultados mostraron que 2H6 (Fig. 16), 5G7 (Fig. 17), HK1L2 (Fig. 19) y HK5L5 (Fig. 20) presentaron una reactividad menor frente a muchos mutantes de alanina en los que cada residuo en el extremo N-terminal o el 2.º bucle se reemplazó con alanina. En particular, se observó reactividad baja o nula frente a los mutantes Y14A, D16A y L17A. Además, la reactividad frente a E8A, F13A, C22A e Y177A fue menor entre estos mutantes. En conjunto, estos resultados indican que 2H6, 5G7, HK1L2 y HK5L5 reconocen E8, F13, Y14, D16, L17, C22 e Y177 en el dominio extracelular del XCR1 humano. 11H2 (Fig. 18) mostró una reactividad similar frente a otros mAbs, salvo F13A y D16A, lo cual indica que 11H2 se une a E8, Y14, L17, C22 e Y177.

Ejemplo 10

Competición entre los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2), que reconocen epítomos similares, para la unión a células que expresan XCR1 humano

Para determinar si los anticuerpos anti-XCR1 humano, que reconocen epítomos similares, compiten entre sí por la unión al XCR1 humano, se llevó a cabo un ensayo de competición.

El ensayo de competición se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento. Se mezclaron células B300.19 parentales y células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano con una proporción de 1:1, y se suspendieron en un tampón FACS (PBS- (Sigma) que contenía un 1% de suero fetal bovino). Las células se bloquearon durante 10 minutos en hielo con un tampón FACS que contenía un 10% de suero de rata. A continuación, las células se incubaron con anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 o 11H2), anticuerpos de control de isotipo de ratón, IgG2a (eBioscience, #16-4724-85) o IgG2b (eBioscience, #16-4732-85), en varias concentraciones comprendidas entre 0 y 10 µg/mL en el tampón FACS durante 20 minutos en hielo. A continuación, las células se incubaron con anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón biotinilado (5G7) en una concentración de 0.3 µg/mL en el tampón FACS durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron con el tampón FACS tres veces y a continuación se incubaron durante 20 minutos en hielo con estreptavidina marcada con PE (BD Pharmingen, #554061, diluida en el tampón FACS con un factor de dilución de 1:50). Las células se lavaron tres veces con el tampón FACS y a continuación se suspendieron en el tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un analizador celular FACSCanto II (BD Bioscience).

El anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón biotinilado (5G7) competía por la unión a células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 consigo mismo 5G7 sin marcar, y con 2H6 y 11H2 sin marcar que reconocen epítomos similares en el XCR1 humano (Fig. 21). Por otra parte, los anticuerpos de control no compitieron con el anticuerpo biotinilado (5G7) por la unión a células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano.

Ejemplo 11

Reactividad del anticuerpo anti-XCR1 humano monoclonal producido en ratón, 5G7, y anticuerpos anti-XCR1 humano monoclonales humanizados, HK1L2 y HK5L5, frente a varios receptores de quimiocinas humanas

La reactividad del anticuerpo anti-XCR1 humano monoclonal producido en ratón, 5G7, y los anticuerpos anti-XCR1 humano monoclonales humanizados, HK1L2 y HK5L5, frente a varios receptores de quimiocinas humanas se evaluó mediante un análisis por FACS.

Se suspendieron células B300.19 parentales y células B300.19 que expresan receptores de quimiocinas humanas (XCR1, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CCR1, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR11 o CX3CR1) unidos a EGFP en un tampón FACS (PBS- (Sigma) que contenía un 1% de suero fetal bovino) en una concentración de 1×10^6 células/mL y se dispensaron alícuotas de 100 μ L en pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. A continuación, las células se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Se diluyeron el mAb anti-XCR1 humano producido en ratón, 5G7, el anticuerpo IgG2b de control de isotipo de ratón (eBioscience, #14-4732-82), anticuerpos anti-XCR1 humano monoclonales humanizados, HK1L2 y HK5L5, y la IgG de control humana (Mitsubishi, #128-26053-9) con el tampón FACS hasta una concentración de 5 μ g/mL. Se diluyeron anticuerpos anti-XCR1 humano policlonales producidos en cabra marcados con PE (R&D, #FAB857P, y LifeSpan BioScience, #LS-C76885) con el tampón FACS con factores de dilución de 2:5 y 1:5, respectivamente. Se añadieron 50 μ L de los anticuerpos diluidos a cada pocillo y las células se incubaron durante 20 minutos en hielo. A continuación, las células se lavaron tres veces con el tampón FACS. Se añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón policlonal marcado con PE (Jackson, #715-116-151, diluido con el tampón FACS con un factor de dilución de 1:50) a las células que se habían incubado con 5G7 o anticuerpo de control de isotipo de ratón. Se añadió anticuerpo anti-IgG humano policlonal marcado con PE (Jackson, #709-116-149, diluido con el tampón FACS con un factor de dilución de 1:50) a las células que se habían incubado con HK1L2, HK5L5 o IgG de control humana. Se añadió tampón FACS a las células que habían sido incubadas con anticuerpos anti-XCR1h policlonales. A continuación, las células se incubaron durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron con el tampón FACS tres veces y después se suspendieron en el tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un analizador celular FACSCanto II y se expresó como un valor medio del delta de PE. El valor medio del delta de PE se calculó sustrayendo el valor medio de PE de fondo de cada valor medio de PE, que se obtuvo mediante la tinción de cada línea celular con cada anticuerpo.

El anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón, 5G7, reaccionó selectivamente frente a células B300.19 que expresan EGFP-XCR1 humano, salvo con células que expresan EGFP-CX3CR1 humano (Fig. 22). Por otro lado, los anticuerpos anti-XCR1 humano policlonales producidos en cabra reaccionaron frente a varias células que expresan receptores de quimiocinas humanas unidos a EGFP además de frente a células que expresan EGFP-XCR1 (Fig. 22). Los anticuerpos anti-XCR1 humano humanizados, HK1L2 y HK5L5, mostraron una reactividad reducida frente a células que expresan EGFP-CX3CR1 humano a pesar de su alta reactividad frente a células que expresan EGFP-XCR1 humano (Fig. 23).

Ejemplo 12

Efecto de 5G7 Mab sobre la respuesta HTR inducida por *Mycobacterium butyricum*

Se sabe que una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (HTR) es uno de los principales mecanismos que provocan enfermedades autoinmunitarias tales como tiroiditis, artritis reumatoide y diabetes de tipo 1 cuando su respuesta se dirige contra autoantígenos (Actor, J.K. y Ampel, N.M. (diciembre de 2009) Hypersensitivity: T Lymphocyte-mediated (Type IV), en: Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd: Chichester). La interacción entre linfocitos T y células dendríticas es fundamental para estas respuestas HTR. Por lo tanto, se cree que la inhibición de la interacción entre linfocitos T y CD es útil para tratar estas enfermedades. Hemos investigado el efecto del Mab anti-XCR1 humano, 5G7, en un modelo de reacción de HTR, respuesta HTR inducida por *Mycobacterium* (M.) *butyricum*, en ratones en los que se han insertado secuencias génicas del XCR1 humano (Mihara, M. et al., Immunology Letters 2002, 84: 223-229; Mohan K et al., Eur. J. Immunol. 2005, 35: 1702-1711).

(Métodos)

Los ratones que han sido sometidos a técnicas de ingeniería genética para la inserción de secuencias génicas de XCR1h, en los que se expresa el XCR1 humano en vez del XCR1 de ratón, se inmunizaron subcutáneamente con M. butyricum termoinactivado (100 μ g/cabeza) en aceite mineral el Día 0. El Mab 5G7 o la IgG de ratón de control (Jackson Laboratory) se inyectaron por vía intraperitoneal en una dosis de 500 μ g/cabeza el Día 1, el Día 3, el Día 7 y el Día 9. Diez días después de la inmunización con M. butyricum, los ratones se estimularon con M. butyricum suspendido en aceite mineral en la almohadilla plantar derecha (20 μ g/pie, estimulación con M. butyricum) y únicamente aceite mineral en la almohadilla plantar izquierda (estimulación con control). Un día después de la inyección de estimulación, la respuesta HTR se evaluó midiendo el grosor de almohadilla plantar de cada almohadilla plantar. La inflamación de almohadilla plantar se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Inflamación de almohadilla plantar} = ([A] - [B]) - ([C] - [D])$$

[A] = grosor de la almohadilla plantar derecha después de la estimulación con M. butyricum

[B] = grosor de la almohadilla plantar derecha antes de la estimulación con *M. butyricum*

[C] = grosor de la almohadilla plantar izquierda después de la estimulación con control

5 [D] = grosor de la almohadilla plantar izquierda antes de la estimulación con control

(Resultados)

10 Los resultados muestran que la respuesta HTR inducida por *M. butyricum* en ratones tratados con el Mab 5G7 mostraron una respuesta HTC significativamente menor en comparación con los ratones tratados con la IgG de control (Fig. 24).

(Conclusión)

15 Los datos demostraron la eficacia del tratamiento con anticuerpos anti-XCR1 en la respuesta HTR. Esto sugiere que el uso de anticuerpos anti-XCR1 puede ser beneficioso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias provocadas por HTR tales como la tiroiditis, artritis reumatoide y diabetes de tipo 1.

Ejemplo 13

20

Efecto del Mab 5G7 sobre la EAE mediada por el péptido MOG 37-50

25 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante crónica del sistema nervioso central (SNC) humano que se puede caracterizar clínicamente por una remisión-recidiva o un curso progresivo crónico. El modelo de EM en animales estudiado en mayor profundidad, encefalomeningitis autoinmune experimental (EAE), habitualmente produce un déficit de las funciones motoras. Muchos informes mostraron que los linfocitos T desempeñan funciones cruciales en la patogénesis de la EM y EAE. Por lo tanto, hemos llevado a cabo un experimento del modelo de EAE para investigar la actividad inhibitoria del Mab 5G7 sobre la patogénesis de MS.

30 (Método experimental)

1. Ratones muestra

35 En el experimento se emplearon ratones en los que se habían insertado secuencias génicas de XCR1 (de edades comprendidas entre 7 y 12 semanas), en los que se expresa el XCR1 humano en vez del XCR1 de ratón de ascendencia C57BL/6.

2. Inducción de EAE

40 La inducción de EAE se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en la revista Eur. J. Immunol. 2005, 35: 76-85, en el que se menciona la posible participación de los linfocitos T CD8+ en el desarrollo de EAE. Resumiendo, en los ratones en los que se habían insertado secuencias génicas de XCR1 se inyectaron por vía subcutánea 200 µg del péptido glucoproteína de la mielina de oligodendrocitos 37-50 (MOG 37-50) emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) que contenía 20 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Se administraron 200 ng de la toxina de la tosferina por vía intravenosa los Días 0 y 2, postinmunización.

3. Método para administrar anticuerpos

50 El anticuerpo anti-XCR1 humano monoclonal producido en ratón (5G7) y su anticuerpo de control, es decir, IgG de ratón (Jackson Laboratory), se prepararon en PBS hasta una concentración final de 2 mg/mL. Cada uno de los anticuerpos anteriores se administró por vía intravenosa en los ratones con un volumen de 250 µl/ratón (500 µg/ratón) el Día 7, el Día 10, el Día 14 y el Día 17.

4. Puntuación de la patología de este modelo

55 Los síntomas clínicos de la EAE se monitorizaron desde el día de la inmunización y se puntuaron en una escala de 0-5, en función de los siguientes criterios:

60 grado 0: sin enfermedad, grado 0.5: parálisis de la cola leve, grado 1: parálisis de la cola, grado 2: ritmo irregular al andar, grado 2.5: una pata trasera paralizada, grado 3: parálisis de las patas traseras, grado 4: patas traseras y delanteras paralizadas, y grado 5: estado agónico o muerte.

(Resultados experimentales y conclusión)

65 La puntuación clínica obtenida de los ratones a los que se administró el Mab 5G7 mostró niveles menores a los de los ratones a los que se les administró la IgG de control (Fig. 25). Los datos indicaron que el tratamiento con el

anticuerpo anti-XCR1 mostró un cierto nivel de supresión del desarrollo de EAE y sugirieron que el tratamiento con anticuerpos anti-XCR1 puede ser beneficioso para la EM en seres humanos.

Ejemplo 14

Inhibición de la unión de la XCL1 humana a células que expresan el XCR1 humano con anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2)

Para determinar si los anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) inhiben la unión de la XCL1 humana a el XCR1 humano, se llevó a cabo un ensayo de unión competitiva de ligandos.

En primer lugar, la unión de la XCL1 humana-SSS-His(10) a células BaF3 que expresan EGFP-XCR1 humano se determinó de acuerdo con el siguiente procedimiento. Las células BaF3 parentales y las células BaF3 que expresan EGFP-XCR1 humano se mezclaron con una proporción de 1:1, y se suspendieron en un tampón FACS (PBS- (Sigma) que contenía un 1% de FBS). Las células se incubaron durante 30 minutos en hielo con una concentración creciente de XCL1 humana-SSS-His(10) en presencia o ausencia de XCL1 soluble 2.5 μ M (R&D, #695-LT-025/CF) en el tampón FACS. A continuación, las células se lavaron con el tampón FACS tres veces y después se incubaron durante 20 minutos en hielo con anticuerpo anti-6x marcado con His (BETHYL, #A190-114A, con un factor de dilución 1:100 en el tampón FACS). Las células se volvieron a lavar con el tampón FACS tres veces y después se incubaron durante 20 minutos en hielo con el anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con PE (Jackson, #711-166-152, con un factor de dilución de 1:50 en el tampón FACS). Después, las células se volvieron a lavar tres veces con el tampón FACS y a continuación se suspendieron en el tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un analizador celular FACSCanto II (BD Bioscience). La especificidad de unión se determinó sustrayendo la unión no específica (en presencia de XCL1 soluble 2.5 μ M) de la unión total (en ausencia de XCL1 soluble 2.5 μ M).

El ensayo de unión competitiva de ligandos se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento. Las células BaF3 parentales y las células BaF3 que expresan EGFP-XCR1 humano se mezclaron con una proporción de 1:1, y se suspendieron en un tampón FACS (PBS- (Sigma) que contenía un 1% de FBS). Las células se bloquearon durante 10 minutos en hielo con un tampón FACS que contenía un 10% de suero de rata. A continuación, las células se incubaron durante 20 minutos en hielo con anticuerpos anti-XCR1 humano producidos en ratón (2H6, 5G7 o 11H2), anticuerpos de control de isotipo de ratón, IgG2a (eBioscience, #16-4724-85) o IgG2b (eBioscience, #16-4732-85), en varias concentraciones comprendidas entre 0 y 150 μ g/mL. Seguidamente, las células se incubaron durante 30 minutos en hielo con XCL1 humano-SSS-His(10) con una concentración de saturación de 0.12 μ g/mL. Las células se lavaron tres veces con el tampón FACS y a continuación se incubaron durante 20 minutos en hielo con anticuerpo anti-6x marcado con His (BETHYL, #A190-114A, con un factor de dilución de 1:100 en tampón FACS). Las células se volvieron a lavar tres veces con el tampón FACS y a continuación se incubaron durante 20 minutos en hielo con el anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con PE (Jackson, #711-166-152, con un factor de dilución de 1:50 en tampón FACS). Posteriormente, las células se volvieron a lavar tres veces con el tampón FACS y a continuación se suspendieron en el tampón FACS. Se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un analizador celular FACSCanto II (BD Bioscience).

La unión de la XCL1 humana a células BaF3 que expresan EGFP-XCR1 humano se inhibió con los anticuerpos anti-XCR1 producidos en ratón (2H6, 5G7 y 11H2) y las IC_{50} de los anticuerpos fueron 37.0, 6.9 y 23.8 nM, respectivamente. Por otro lado, los anticuerpos de control no inhibieron la unión de la XCL1 humana a células BaF3 que expresan EGFP-XCR humano.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.

<120> ANTICUERPOS ANTI-XCR1 HUMANO

<130> P12-035

<150> US 61/530194

<151> 01-09-2011

<150> US 61/659637

<151> 14-06-2012

<160> 119

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (2H6)

<400> 1

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

Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	His
			20					25					30		

Asn	Met	His	Trp	Ile	Lys	Gln	Thr	Leu	Arg	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

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

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

Thr	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	115						120	

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (2H6)

<400> 2

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

Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

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

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser
			85						90					95	

Thr	Phe	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 3

<211> 363

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (2H6)

<400> 3

caggcttatc tacagcagtc tggggctgaa ctggtgaggc ctggggcctc agtgaagatg
60

tcctgcaagg cttctggcta cacatttagc agtcacaata tgcaactggat aaagcagaca
120

cttagacagg gcctggaatg gataggagct atttatccag gaaaaggtaa tacttcctac
180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac
240

atgcagctca gcagcctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagatggggg
300

tcggtagtag gagactgcta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctct
360

tca
363

<210> 4

<211> 336

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (2H6)

<400> 4

gatgtttgtg tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc
60

atctcttgca gatctagtca gaggcttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagagtttc caatcgattt
180

tctggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggattagga gagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac atttgttccg
300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa
336

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7)

<400> 5

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
20 25 30

Asn Leu His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Gln Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7)

ES 2 684 173 T3

<400> 6

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

Asn Gln Ala Ser Ile Phe Cys Arg Ser Ser Leu Gly Leu Val His Arg
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser His Arg Phe Ser 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7

<211> 363

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7)

<400> 7

caggcttata ttcagcagtc tggggctgaa ctggtgaggc ctggggcctc agtgaagatg
60

tcctgcaagg cttctggcta cacattcacc agtcacaatt tgcactgggt aaagcagaca
120

cctagacagg gcctgcaatg gattggagct atttatccag gaaatggtaa tactgcctac
180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccacgctg actgtagaca aatcctccag tacagcctac
240

atgcagctca gcagcctgac atctgatgac tctgcggtct acttctgtgc aagatggggt
300

tcggtttag gagactggta cttcgacgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 8

<211> 336

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (5G7)

<400> 8

gatgtttaga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca ctcttgaaa tcaagcctcc
60

atTTTTtga gatctagtct gggccttga cacagaaatg gaaacaccta ttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctc ccaccgattt
180

tctggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggctcaggga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tctgggggtt tatttctgct ctcaaagtac ccatgttccg
300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa
336

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (11H2)

<400> 9

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

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (11H2)

ES 2 684 173 T3

<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Arg
85 90 95

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

<210> 11

<211> 366

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (11H2)

<400> 11

gaggtccagc ttcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg
60

tcctgtaagg cttctggata cacattcact gactactatg tgaactgggt gaaacagagc
120

catggagcga gcottgagtg gattggagtt agtaatccta agaacgggtga taaaagttac
180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag tacagcctac
240

atggagctca acagcctgac atctgaggac tctgctgtct attactgtgc aagagggctt
300

tactacgctg gtacctacgg gtacttcgat gtctggggca cggggaccac ggtcaccgtc
360

tcctca
366

<210> 12

<211> 321

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano producido en ratón (11H2)

<400> 12

gatatccaga tgacacaggc tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc
60

atcagttgta gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaagcca
120

gatggaactg ttaaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg tgtcccatca
180

aggttcagag gcagtgggtc tgggacagat ttctctctca ccattagcaa cctggagcaa
240

gaagatattg ccacttattt ttgccaacag ggtaaaacgc ttctctggac gctcggtgga
300

ggcaccaagc tggaaatcaa a
321

<210> 13

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano quimérico

<400> 13

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

Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	His
			20					25					30		

Asn	Leu	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Arg	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Ile
		35					40					45			

Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

ES 2 684 173 T3

Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Trp	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	
			100					105					110			
Thr	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
		115					120					125				
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	
	130					135					140					
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
145					150					155					160	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
				165					170					175		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
			180					185					190			
Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	
		195					200					205				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	
	210					215					220					
Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	
225					230					235					240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
				245					250					255		
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
			260					265					270			
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
		275					280					285				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	

ES 2 684 173 T3

290

295

300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano quimérico

<400> 14

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

ES 2 684 173 T3

Asn Gln Ala Ser Ile Phe Cys Arg Ser Ser Leu Gly Leu Val His Arg
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser His Arg Phe Ser 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15

 $\langle 211 \rangle$ 1344

<212> ADN

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano quimérico

<400> 15

caggcttatc ttcagcagtc tggggctgaa ctggtgaggc ctggggcctc agtgaagatg
60

tcctgcaagg cttctggcta cacattcacc agtcacaatt tgcactgggt aaagcagaca
120

cctagacagg gcctgcaatg gattggagct atttatccag gaaatggtaa tactgcctac
180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccacgctg actgtagaca aatcctccag tacagcctac
240

atgcagctca gcagcctgac atctgatgac tctgcggtct acttctgtgc aagatgggggt
300

tcggttgtag gagactggta cttcgacgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc
360

tcagctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc
420

gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg
480

tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc
540

tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcaactt cggcaccacg
600

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag
660

cgaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgccgcagc cccgtcagtc
720

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg
780

tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac
840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc
900

cggtgtggtca gogtcctcac cgtcgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag
960

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa
1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag
1080

aaccaggtca gcttgacctg cctgggtcaaa ggctttctacc ccagcgacat cgccgtggag
1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc
1200

gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg
1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc
1320

ctctccctgt ctccgggtaa atga
1344

<210> 16

<211> 660

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano quimérico

<400> 16

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca ctcttgaaa tcaagcctcc
60
attttttgta gatctagtct gggccttgta cacagaaatg gaaacaccta ttacattgg
120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcttgatct acaaagtttc ccaccgattt
180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggctcaggga cagatttcac actcaagatc
240
agcagagtgg aggctgagga tctgggggtt tatttctgct ctcaaagtac ccatgttccg
300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc
360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg
420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa
480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
540
agcagcacc ctagcgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa
600
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag
660

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena pesada de 5G7

<400> 17

Ser His Asn Leu His
1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena pesada de 5G7

<400> 18

Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena pesada de 5G7

<400> 19

Trp	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10		

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena ligera de 5G7

<400> 20

Arg	Ser	Ser	Leu	Gly	Leu	Val	His	Arg	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena ligera de 5G7

<400> 21

Lys Val Ser His Arg Phe Ser
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena ligera de 5G7

<400> 22

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 23

<211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena pesada de 5G7

<400> 23

agtcacaatt tgcac
15

<210> 24

<211> 51

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena pesada de 5G7

<400> 24

gctatttatac caggaaatgg taatactgcc tacaatcaga agttcaaggg c
51

<210> 25

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena pesada de 5G7

<400> 25

tgggggttcgg ttgtaggaga ctggtacttc gacgtc
36

<210> 26

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena ligera de 5G7

<400> 26

agatctagtc tgggccttgt acacagaaat ggaaacacct atttacat
48

<210> 27

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena ligera de 5G7

<400> 27

aaagtttccc accgattttc t
21

<210> 28

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena ligera de 5G7

<400> 28

tctcaaagta cccatgttcc gtggacg
27

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena pesada de 2H6

<400> 29

Ser His Asn Met His
1 5

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena pesada de 2H6

<400> 30

Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena pesada de 2H6

<400> 31

Trp	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10		

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena ligera de 2H6

<400> 32

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena ligera de 2H6

<400> 33

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena ligera de 2H6

<400> 34

Ser Gln Ser Thr Phe Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 35

<211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena pesada de 2H6

<400> 35

agtcacaata tgcac
15

<210> 36

<211> 51

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena pesada de 2H6

<400> 36

gctatttatc caggaaaagg taatacttcc tacaatcaga agttcaaggg c
51

<210> 37

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena pesada de 2H6

<400> 37

tgggggttcgg tagtaggaga ctggtacttc gatgtc
36

<210> 38

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena ligera de 2H6

<400> 38

agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct atttacat

48

<210> 39

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena ligera de 2H6

<400> 39

agagtttcca atcgattttc t
21

<210> 40

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena ligera de 2H6

<400> 40

tctcaaagta catttgttcc gtggacg
27

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena pesada de 11H2

<400> 41

Asp Tyr Tyr Val Asn
1 5

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena pesada de 11H2

<400> 42

Val Ser Asn Pro Lys Asn Gly Asp Lys Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena pesada de 11H2

<400> 43

Gly Leu Tyr Tyr Ala Gly Thr Tyr Gly Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena ligera de 11H2

<400> 44

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

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena ligera de 11H2

<400> 45

Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser
1				5		

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena ligera de 11H2

<400> 46

Gln	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Arg	Thr
1				5				

<210> 47

<211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena pesada de 11H2

<400> 47

gactactatg tgaac
15

<210> 48

<211> 51

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena pesada de 11H2

<400> 48

gttagtaatc ctaagaacgg tgataaaagt tacaaccaga agttcaaggg c
51

<210> 49

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena pesada de 11H2

<400> 49

gggcttttact acgctggtac ctacgggtac ttogatgtc
39

<210> 50

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de la cadena ligera de 11H2

<400> 50

agggaagtc aggaattag caattattta aac
33

<210> 51

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de la cadena ligera de 11H2

<400> 51

tacacatcaa gattacactc a
21

<210> 52

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de la cadena ligera de 11H2

<400> 52

caacagggta aaacgcttcc tcggacg
27

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencias de aminoácidos generalizadas de las regiones determinantes de la complementariedad de 5G7 y 2H6 (CDR 1 de la cadena pesada)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4) .. (4)

<223> X is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<400> 53

Ser	His	Asn	Xaa	His
1				5

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencias de aminoácidos generalizadas de las regiones determinantes de la complementariedad de 5G7 y 2H6 (CDR 2 de la cadena pesada)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile,
Leu,
Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile,
Leu,
Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<400> 54

Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Xaa	Gly	Asn	Thr	Xaa	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencias de aminoácidos generalizadas de las regiones determinantes de la complementariedad de 5G7 y 2H6 (CDR 3 de la cadena pesada)

<400> 55

Trp	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10		

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencias de aminoácidos generalizadas de las regiones determinantes de la complementariedad de 5G7 y 2H6 (CDR 1 de la cadena ligera)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<400> 56

Arg	Ser	Ser	Xaa	Xaa	Leu	Val	His	Xaa	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His
1				5				10						15	

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencias de aminoácidos generalizadas de las regiones determinantes de la complementariedad de 5G7 y 2H6 (CDR 2 de la cadena ligera)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<400> 57

Xaa Val Ser Xaa Arg Phe Ser
1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencias de aminoácidos generalizadas de las regiones determinantes de la complementariedad de 5G7 y 2H6 (CDR 3 de la cadena ligera)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa is Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile,
Leu,
Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val.

<400> 58

Ser	Gln	Ser	Thr	Xaa	Val	Pro	Trp	Thr
1				5				

<210> 59

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado
(HK1)

<400> 59

ES 2 684 173 T3

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 His
20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 684 173 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser

ES 2 684 173 T3

385 390 395 400

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

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

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

<210> 60

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (HK1)

<400> 60

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 His
20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61

<211> 1344

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (HK1)

<400> 61

caggtgcagc tgggtgcagtc tggagccgaa gtgaagaaac caggggcctc tgtcaaggctg
60

agttgcaagg cctccggtta cactttcacc tcccacaacc tgcattgggt gagacaggct
120

cctggacagc gactggagtg gatgggagca atctaccag gcaacggaaa tactgcctat
180

aatcagaagt ttaaaggcag ggtgacaatt actcgggaca cttccgcaag caccgcctac
240

atggagctgt ccagcctgag gagtgaagat accgctgtgt actattgtgc acgatgggga
300

tccgtggctg gagactggta ttctgatgtg tgggggcagg gtaccctggc cacagtgtct
360

agtgcctcca caaagggccc cagcgtgttt ccactggctc cctgctctag gagtacatca
420

gagtccactg ccgctctggg atgtctgggt aaggactatt tccctgaacc agtcaccgtg
480

agttggaact caggggctct gacatctggc gtccacactt ttcttgagc gctgcagtca
540

tccggcctgt actccctgag ctctgtggct acagtcccaa gttcaaattt cggaaccag
600

acataactt gcaacgtgga ccataagccc agcaatacca aggtcgataa aacagtggag
660

cgaaagtgt gtgtcgaatg cccaccttgt ccagctccac cagcagcagc tccttctgtg
720

ttcctgtttc ctccaaagcc aaaagacact ctgatgatca gccggacccc cgaggtcaca
780

tgtgtggtcg tggacgtgtc tcacgaggat cctgaagtcc agtttaactg gtacgtggat
840

ggggtcgaag tgcataatgc aaagacaaaa ccacgagagg aacagttcaa ctctacattt
900

cgtgtcgtga gtgtgctgac tgtcgtgcac caggattggc tgaacggcaa ggagtataag
960

tgcaaagtgt ccaataaggg actgcccgcc cctatcgaga aaactattag caagaccaa
1020

ggccagccta gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccta gtgcgcgagga aatgactaag
1080

aaccaggtct cactgacctg tctggtgaaa gggttctatc ccagcgacat tgccgtggag
1140

tgggaatcta atggtcagcc tgagaacaat tacaagacca caccacccat gctggactcc
1200

gatgggagct tctttctgta ttcaaagctg accgtggata aatccaggtg gcagcagggt
1260

aatgtcttta gctgctctgt gatgcacgaa gccctgcaca accattacac tcagaagtcc
1320

ctgtccctgt cacctggaaa gtga
1344

<210> 62

<211> 363

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (HK1)

<400> 62

caggtgcagc tgggtgcagtc tggagccgaa gtgaagaaac caggggcctc tgtcaaggtg
60

agttgcaagg cctccgggta cactttcacc tcccacaacc tgcattgggt gagacaggct
120

cctggacagc gactggagtg gatgggagca atctaccag gcaacggaaa tactgcctat
180

aatcagaagt ttaaaggcag ggtgacaatt actcgggaca cttccgcaag caccgcctac

240

atggagctgt ccagcctgag gagtgaagat accgctgtgt actattgtgc acgatgggga
300

tccgtggctg gagactggta tttcgatgtg tgggggcagg gtaccctggt cacagtgtct
360

agt
363

<210> 63

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado
(HK5)

<400> 63

ES 2 684 173 T3

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 His
20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys 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
85 90 95

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

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

ES 2 684 173 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 684 173 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 64

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (HK5)

<400> 64

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 His
20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe

ES 2 684 173 T3

50

55

60

Lys 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
85 90 95

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65

<211> 1344

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado
(HK5)

<400> 65

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggccgaa gtgaagaaac caggggcttc tgtcaagggtg
60

agttgcaaag catcaggtta cactttcacc tcccacaacc tgcattgggt gcgacaggct
120

cctggacagg gactggagtg gatgggagca atctaccag ggaacggtaa taccgcttat
180

aatcagaagt ttaaaggcag ggtcacaatg actcgggaca cctccacaag cactgtgtac
240

atggagctgt ccagcctgcg aagtgaagat acagcagtgt actattgtgc acgttgggga
300

tccgtggtcg gtgactggta tttcgatgtg tggggccagg gaaccctggt cacagtgtct
360

agtgcctcca ctaaggggcc cagcgtgttt ccaactggcac cctgctctcg gagtacttca
420

gagtccaccg ccgctctggg ctgtctggtg aaggactatt tccctgaacc agtcacagtg
480

agttggaact caggcgcact gacttctgga gtccacacct ttctgccgt gctgcagtca

540

tccggcctgt actccctgag ctctgtggtc actgtcccaa gttcaaattt cggaacccag
600

acataacttt gcaacgtgga ccataagccc agcaatacaa aggtcgataa aactgtggag
660

agaaagtgct gtgtggaatg cccaccttgt ccagcaccac cagcagcagc tccttctgtg
720

tctctgtttc ctccaaagcc aaaagacaca ctgatgatca gccgcacacc cgaggctcact
780

tgtgtgggtcg tggacgtgtc tcacgaggat cctgaagtcc agtttaactg gtacgtggat
840

ggcgtcgaag tgcataatgc caagaccaa ccaagagagg aacagttcaa ctctactttt
900

cgcgtcgtga gtgtgctgac cgtcgtgcac caggattggc tgaacggcaa ggagtataag
960

tgcaaagtgt ccaataaggg actgcccgtc cctatcgaga aaaccattag caagacaaaa
1020

ggacagccta gggaaccaca ggtgtacacc ctgcccccta gtccgggagga aatgaccaag
1080

aaccaggtct cactgacatg tctggtgaaa gggttctatc ccagcgacat tgccgtggag
1140

tgggaatcta atggtcagcc tgagaacaat tacaagacca caccacccat gctggactcc
1200

gatggcagct tctttctgta ttcaaagctg accgtggata aatccaggtg gcagcagga
1260

aatgtcttta gctgctctgt gatgcacgaa gcactgcata atcactacac tcagaagagc
1320

ctgtccctgt cacctggtaa atga
1344

<210> 66

<211> 363

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (HK5)

<400> 66

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggccgaa gtgaagaaac caggggcttc tgtcaagggtg
60

agttgcaaag catcagggtta cactttcacc tcccacaacc tgcattgggt gcgacaggct
120

cctggacagg gactggagtg gatgggagca atctaccag ggaacggtaa taccgcttat
180

aatcagaagt ttaaaggcag ggtcacaatg actcgggaca cctccacaag cactgtgtac
240

atggagctgt ccagcctgcg aagtgaagat acagcagtgt actattgtgc acgttgggga
300

tccgtgggtcg gtgactggta tttcgatgtg tggggccagg gaaccctggt cacagtgtct
360

agt
363

<210> 67

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado
(L2)

<400> 67

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	Leu	Gly	Leu	Val	His	Arg
			20					25					30		

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	His	Arg	Phe	Ser	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	

ES 2 684 173 T3

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 68

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L2)

<400> 68

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 Leu Gly Leu Val His Arg
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser His Arg Phe Ser 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 Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 69

<211> 660

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L2)

<400> 69

gatgtcgtga tgaccagtc tcctctgagc ctgcctgtga ctctgggcca gccagcatca
60

atctcctgcc gatccagcct gggactggtg caccgtaacg ggaataccta cctgcattgg
120

ttccagcaga ggcttggtca gagtccccgg ctgctgatct ataaggtgtc tcacagattc
180

agtggcgctc cagaccgctt tagcggctct ggaagtggga ctgatttcac cctgaaaatt
240

tcccagtggtg aggcagaaga cgtgggagtc tactattgct cacagtccac acatgtgccc
300

tggacttttg gtcagggcac caaggtcgag atcaaacgca ccgtggccgc tcctagcgtc
360

ttcatttttc ccccttctga cgaacagctg aagtcaggaa cagcttccgt ggtctgtctg

420

ctgaacaatt tttaccccag agaggcaaag gtgcagtgga aagtcgataa cgcctgcag
480

agcggcaact cccaggagag tgtgacagaa caggactcaa aggattccac ttatagcctg
540

tctagtaccc tgacactgtc taaagctgat tacgagaagc acaaagtgtg tgcattgtgaa
600

gtcaccacc aggggctgtc atcaccgtc accaagtcct ttaatagagg ggagtgttga
660

<210> 70

<211> 336

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L2)

<400> 70

gatgtcgtga tgaccagtc tcctctgagc ctgcctgtga ctctgggcca gccagcatca
60

atctcctgcc gatccagcct gggactggtg caccgtaacg ggaataccta cctgcattgg
120

ttccagcaga ggccctgggtca gagtccccgg ctgctgatct ataaggtgtc tcacagattc
180

agtggcgtcc cagaccgctt tagcggctct ggaagtggga ctgatttcac cctgaaaatt
240

tcccagagtgg aggcagaaga cgtgggagtc tactattgct cacagtccac acatgtgccc
300

tggacttttg gtcagggcac caaggtcgag atcaaa
336

<210> 71

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado
(L5)

<400> 71

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Leu Gly Leu Val His Arg
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser His Arg Phe Ser 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 Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 72

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L5)

<400> 72

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Leu Gly Leu Val His Arg
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser His Arg Phe Ser 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 Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 73

<211> 660

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L5)

<400> 73

gatattgtga tgactcagac tccactgagc ctgccagtga ctcccggcca gcctgcatca
60

atctcctgca gatccagcct gggactggtg caccgcaacg ggaataccta cctgcattgg
120

tatctgcaga agcctggtca gagtccccag ctgctgatct acaaagtgtc tcacaggttc
180

agtggcgtcc ccgaccggtt tagcggctct ggaagtggga ctgatttcac cctgaagatt
240

tcccgagtgg aggccgaaga cgtgggcgtc tactattgct cacagtccac acatgtgcct
300

tggacttttg gtcagggcac caaggtcgag atcaaaagga ccgtggccgc tccaagcgtc
360

ttcatttttc ccccttctga cgaacagctg aagtcaggaa cagcttcctg ggtctgtctg
420

ctgaacaatt tctaccccag agaggcaaag gtgcagtgga aagtcgataa cgccctgcag
480

agcggcaact cccaggagag tgtgacagaa caggactcaa aggattccac ttatagcctg
540

tctagtaccc tgacactgtc taaagctgat tacgagaagc acaaagtgtg tgcattgtgaa
600

gtcacacacc aggggtctgag ttcccccgtc accaaatcct ttaatcgtgg agagtgtgta
660

<210> 74

<211> 336

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-XCR1 humano humanizado (L5)

<400> 74

gatattgtga tgactcagac tccactgagc ctgccagtga ctcccggcca gcctgcatca
60

atctcctgca gatccagcct gggactgggtg caccgcaacg ggaataccta cctgcattgg
120

tatctgcaga agcctgggtca gagtccccag ctgctgatct acaaagtgtc tcacaggttc
180

agtggcgctcc ccgaccgggtt tagcgggtctt ggaagtggga ctgatttcac cctgaagatt
240

tcccagagtgg aggccgaaga cgtggggcgtc tactattgct cacagtccac acatgtgcct
300

tggacttttg gtcagggcac caaggtcgag atcaaa
336

<210> 75

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia señal

<400> 75

atgggattca gcaggatctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactcc
57

<210> 76

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia señal

<400> 76

atgaagttgc ctgttaggct gttgggtgctg ctgttctggt ttcttgcttc caacact
57

<210> 77

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia señal

<400> 77

atggaatggg catgggtctt tctgttcttt ctgagtgtca caaccggggg gcatagc
57

<210> 78

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia señal

<400> 78

atggaatggg cttgggtctt tctgttcttt ctgtccgtca ctaccggggg ccactct
57

<210> 79

<211> 60

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia señal

<400> 79

atgtccgtgc ctactcaggt gctggggctg ctgctgctgt ggctgaccga tgctcgttgc
60

<210> 80

<211> 60

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia señal

<400> 80

atgtccgtgc ctactcaggt gctggggctg ctgctgctgt ggctgaccga tgctcgttgt
60

<210> 81

<211> 12

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> adaptador 5' ad29S

<400> 81

acatcactcc gt
12

<210> 82

<211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> adaptador 5' obtenido de 29AS

<400> 82

acggagtgat gtccgtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct
50

<210> 83

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 83

agctacgctg aagtatcaac gcagag
26

<210> 84

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 84

aggacagggg ttgattgttg a
21

<210> 85

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 85

ctcaagtttt ttgtccaccg tggtagc
26

<210> 86

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 86

ctcaattttt ttgtccacct tggtagc
26

<210> 87

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 87

gccagtggat agactgatg
19

<210> 88

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 88

ctcattcctg ttgaagctct tgacaat
27

<210> 89

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 89

gatggataca gttggtgcag c
21

<210> 90

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 90

cagatcctca gcctccactc tgct
24

<210> 91

<211> 333

<212> PRT

<213> Abramis brama

<400> 91

ES 2 684 173 T3

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

ES 2 684 173 T3

Ser Ile Leu Asp Thr Ile Phe His Lys Val Leu Ser Ser Gly Cys Asp
165 170 175

Tyr Ser Glu Leu Thr Trp Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Gln His Asn Leu
180 185 190

Phe Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Tyr Val Glu Ile
195 200 205

Leu Arg Thr Leu Phe Arg Ser Arg Ser Lys Arg Arg His Arg Thr Val
210 215 220

Lys Leu Ile Phe Ala Ile Val Val Ala Tyr Phe Leu Ser Trp Gly Pro
225 230 235 240

Tyr Asn Phe Thr Leu Phe Leu Gln Thr Leu Phe Arg Thr Gln Ile Ile
245 250 255

Arg Ser Cys Glu Ala Lys Gln Gln Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Ile Cys
260 265 270

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

Phe Val Gly Val Lys Phe Arg Thr His Leu Lys His Val Leu Arg Gln
290 295 300

Phe Trp Phe Cys Arg Leu Gln Ala Pro Ser Pro Ala Ser Ile Pro His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Ala Phe Ala Tyr Glu Gly Ala Ser Phe Tyr
325 330

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 92

Met Glu Ser Ser Gly Asn Pro Glu Ser Thr Thr Phe
1 5 10

<210> 93

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 93

Ser Ser Gly Asn Pro Glu Ser Thr Thr Phe Phe Tyr
1 5 10

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 94

Gly Asn Pro Glu Ser Thr Thr Phe Phe Tyr Tyr Asp
1 5 10

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 95

Pro	Glu	Ser	Thr	Thr	Phe	Phe	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Gln
1				5					10		

<210> 96

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 96

Ser	Thr	Thr	Phe	Phe	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Gln	Ser	Gln
1				5					10		

<210> 97

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 97

Thr	Phe	Phe	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Gln	Ser	Gln	Pro	Cys
1				5					10		

<210> 98

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 98

Phe	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Gln	Ser	Gln	Pro	Cys	Glu	Asn
1				5					10		

<210> 99

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 99

Tyr	Asp	Leu	Gln	Ser	Gln	Pro	Cys	Glu	Asn	Gln	Ala
1				5					10		

<210> 100

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 100

Leu	Gln	Ser	Gln	Pro	Cys	Glu	Asn	Gln	Ala	Trp	Val
1				5					10		

<210> 101

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 101

Ser	Gln	Pro	Cys	Glu	Asn	Gln	Ala	Trp	Val	Phe	Ala
1				5					10		

<210> 102

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 102

Pro	Cys	Glu	Asn	Gln	Ala	Trp	Val	Phe	Ala	Thr	Leu
1				5					10		

<210> 103

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 103

Glu	Asn	Gln	Ala	Trp	Val	Phe	Ala	Thr	Leu	Ala	Thr
1				5					10		

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 104

Gln Ala Trp Val Phe Ala Thr Leu Ala Thr Thr Val
1 5 10

<210> 105

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 105

Ile Ser Pro Tyr His Trp Gly Trp Val Leu Gly Asp
1 5 10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 106

Tyr His Trp Gly Trp Val Leu Gly Asp Phe Leu Cys
1 5 10

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 107

Gly Trp Val Leu Gly Asp Phe Leu Cys Lys Leu Leu
1 5 10

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 108

Ile Phe His Lys Val Leu Ser Ser Gly Cys Asp Tyr
1 5 10

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 109

Lys Val Leu Ser Ser Gly Cys Asp Tyr Ser Glu Leu
1 5 10

<210> 110

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 110

Ser	Ser	Gly	Cys	Asp	Tyr	Ser	Glu	Leu	Thr	Trp	Tyr
1				5					10		

<210> 111

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 111

Cys	Asp	Tyr	Ser	Glu	Leu	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Ser
1				5					10		

<210> 112

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 112

Ser	Glu	Leu	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Ser	Val	Tyr	Gln
1				5					10		

<210> 113

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 113

Leu	Gln	Thr	Leu	Phe	Arg	Thr	Gln	Ile	Ile	Arg	Ser
1				5					10		

<210> 114

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 114

Leu	Phe	Arg	Thr	Gln	Ile	Ile	Arg	Ser	Cys	Glu	Ala
1				5					10		

<210> 115

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 115

Thr	Gln	Ile	Ile	Arg	Ser	Cys	Glu	Ala	Lys	Gln	Gln
1				5					10		

<210> 116

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 116

Ile Arg Ser Cys Glu Ala Lys Gln Gln Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 117

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido_región extracelular

<400> 117

Cys Glu Ala Lys Gln Gln Leu Glu Tyr Ala Leu Leu
1 5 10

<210> 118

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítipo candidato

<400> 118

Pro Glu Ser Thr Thr Phe Phe Tyr Tyr Asp Leu Gln Ser Gln Pro Cys
1 5 10 15

Glu Asn Gln Ala Trp Val Phe Ala
20

<210> 119

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo candidato

<400> 119

Cys Asp Tyr Ser Glu Leu Thr Trp Tyr Leu Thr Ser
1 5 10

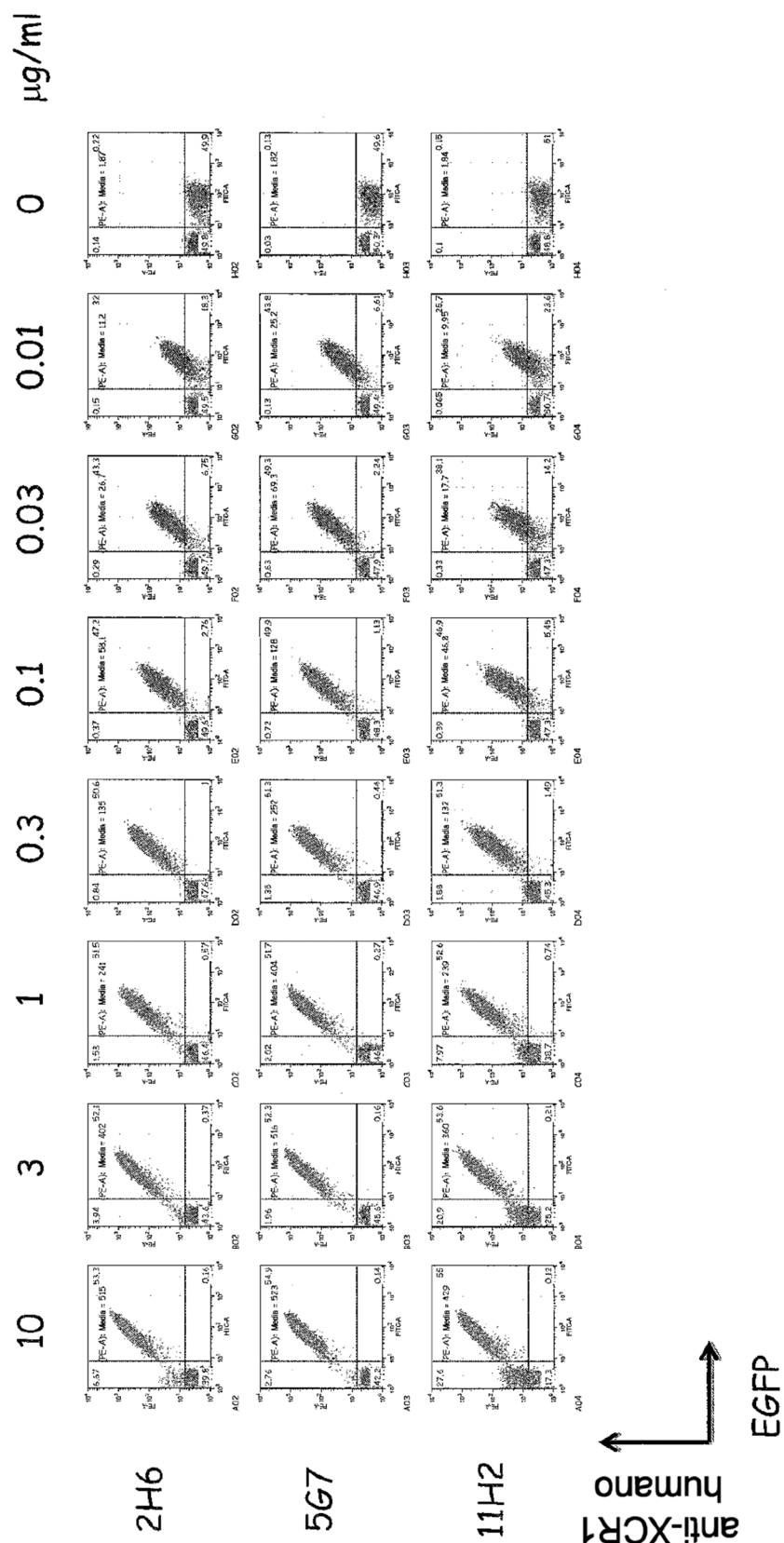
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une al XCR1 humano, donde el anticuerpo es:

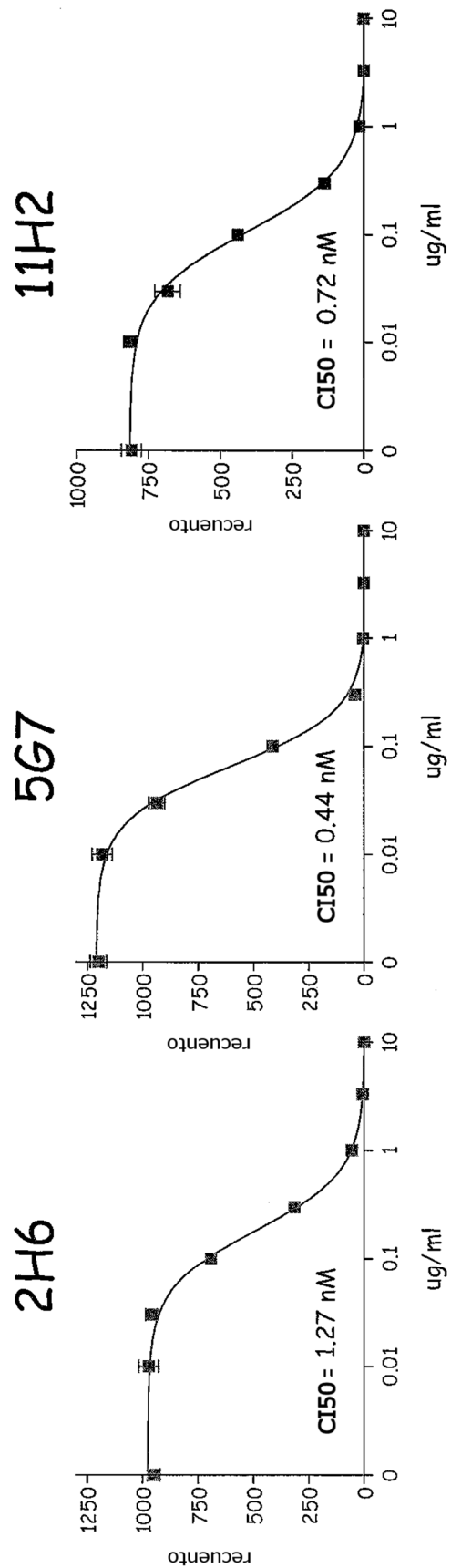
- 5 el anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (g)-(i) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (j)-(l) a continuación;
- 10 el anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (m)-(o) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (p)-(r) a continuación; o
- 15 el anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1-3 de la cadena pesada que se describen en (a)-(c) a continuación y una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR 1-3 de la cadena ligera que se describen en (d)-(f) a continuación:
 - (a) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41,
 - (b) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42,
 - 20 (c) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;
 - (d) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44,
 - 25 (e) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45, y
 - (f) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46;
 - (g) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17,
 - 30 (h) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18,
 - (i) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
 - 35 (j) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20,
 - (k) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21,
 - (l) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;
 - 40 (m) una CDR 1 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29,
 - (n) una CDR 2 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30,
 - 45 (o) una CDR 3 de la cadena pesada constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31;
 - (p) una CDR 1 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32,
 - (q) una CDR 2 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, y
 - 50 (r) una CDR 3 de la cadena ligera constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 o 64, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 o 72.
- 55 3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68.
- 60 4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72.
- 65 5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el anticuerpo comprende una región constante humana.

- 5 6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67.
7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71.
- 10 8. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una región Fc, donde la región Fc se ha mutado para inducir una modificación de la actividad ADCC.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, donde la región Fc se ha mutado para reducir la actividad ADCC.
- 15 10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el anticuerpo está conjugado con una molécula citotóxica.
11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el anticuerpo inhibe la interacción entre el XCR1 humano y la XCL1 humana.
- 20 12. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el anticuerpo inhibe la migración celular de las células dendríticas.
13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el anticuerpo suprime la actividad de los linfocitos T citotóxicos.
- 25 14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un portador o aditivo farmacéuticamente aceptable.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

0 $\mu\text{g/ml}$

0.01

0.03

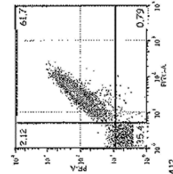
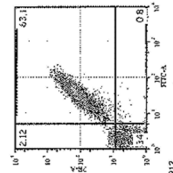
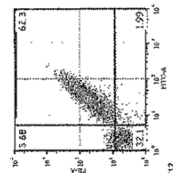
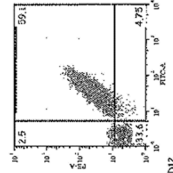
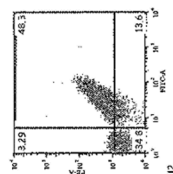
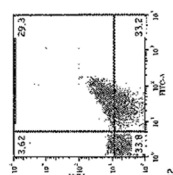
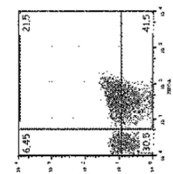
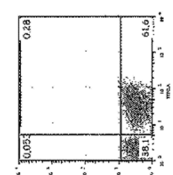
0.1

0.3

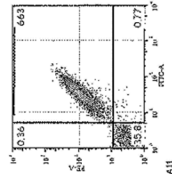
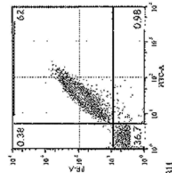
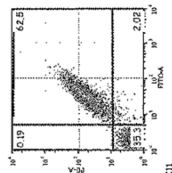
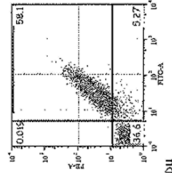
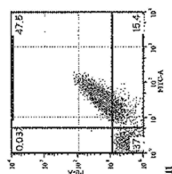
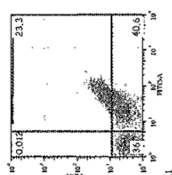
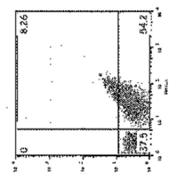
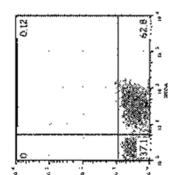
1

3

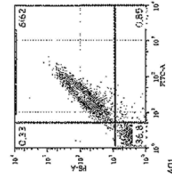
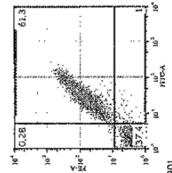
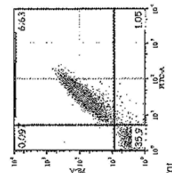
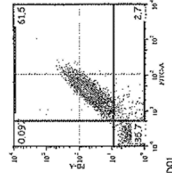
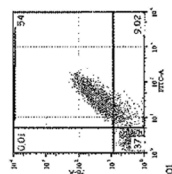
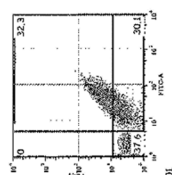
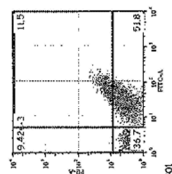
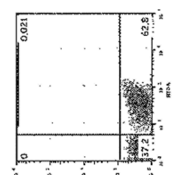
10



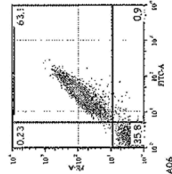
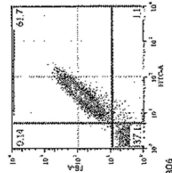
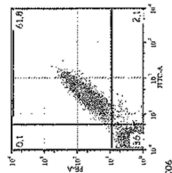
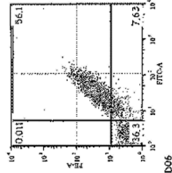
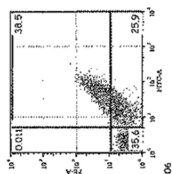
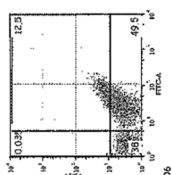
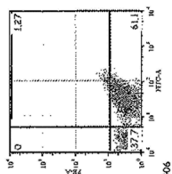
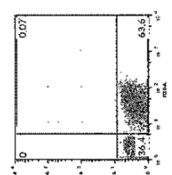
567



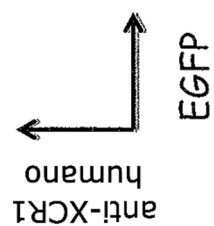
mAb
quimérico



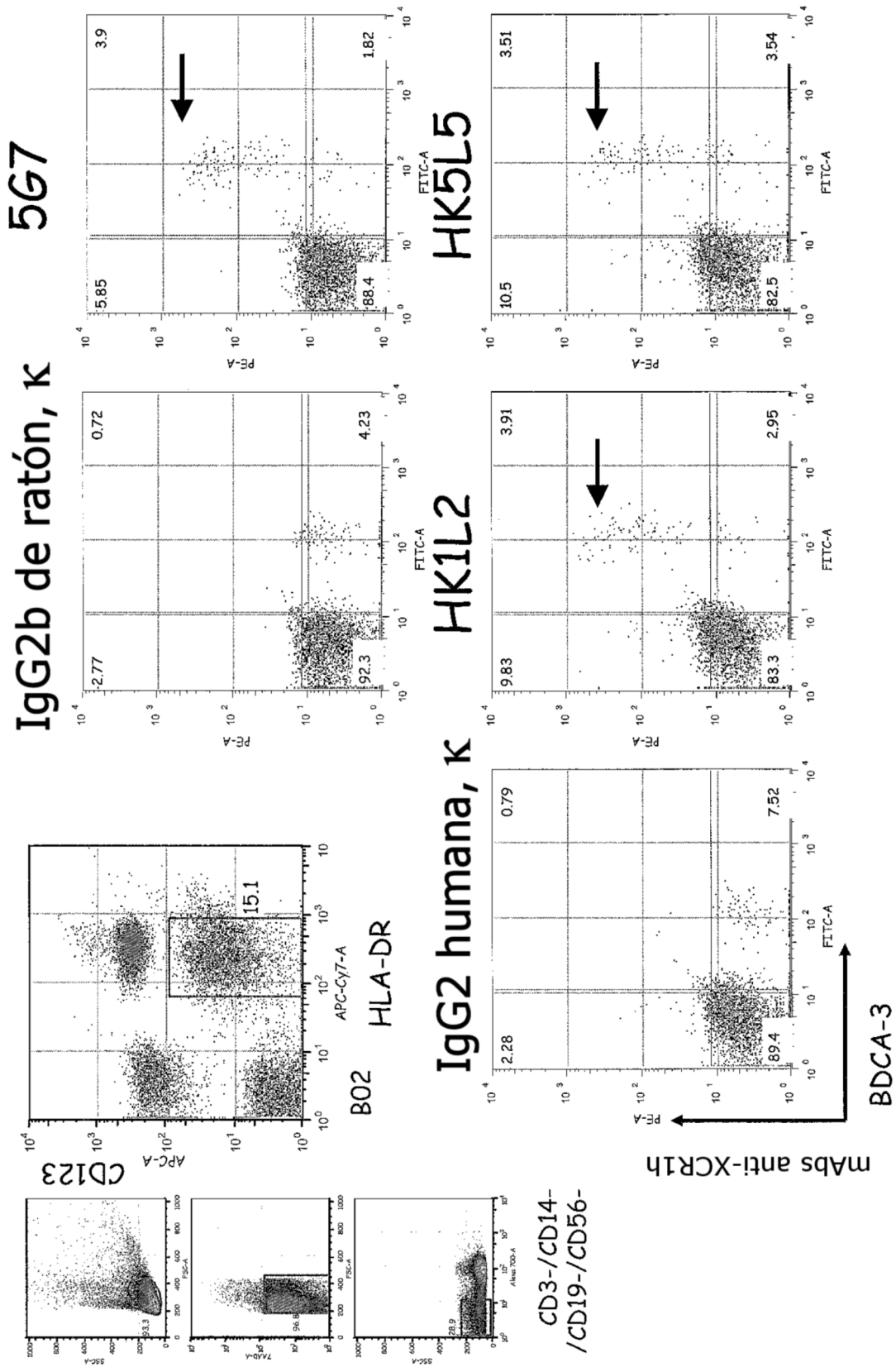
HK1L2



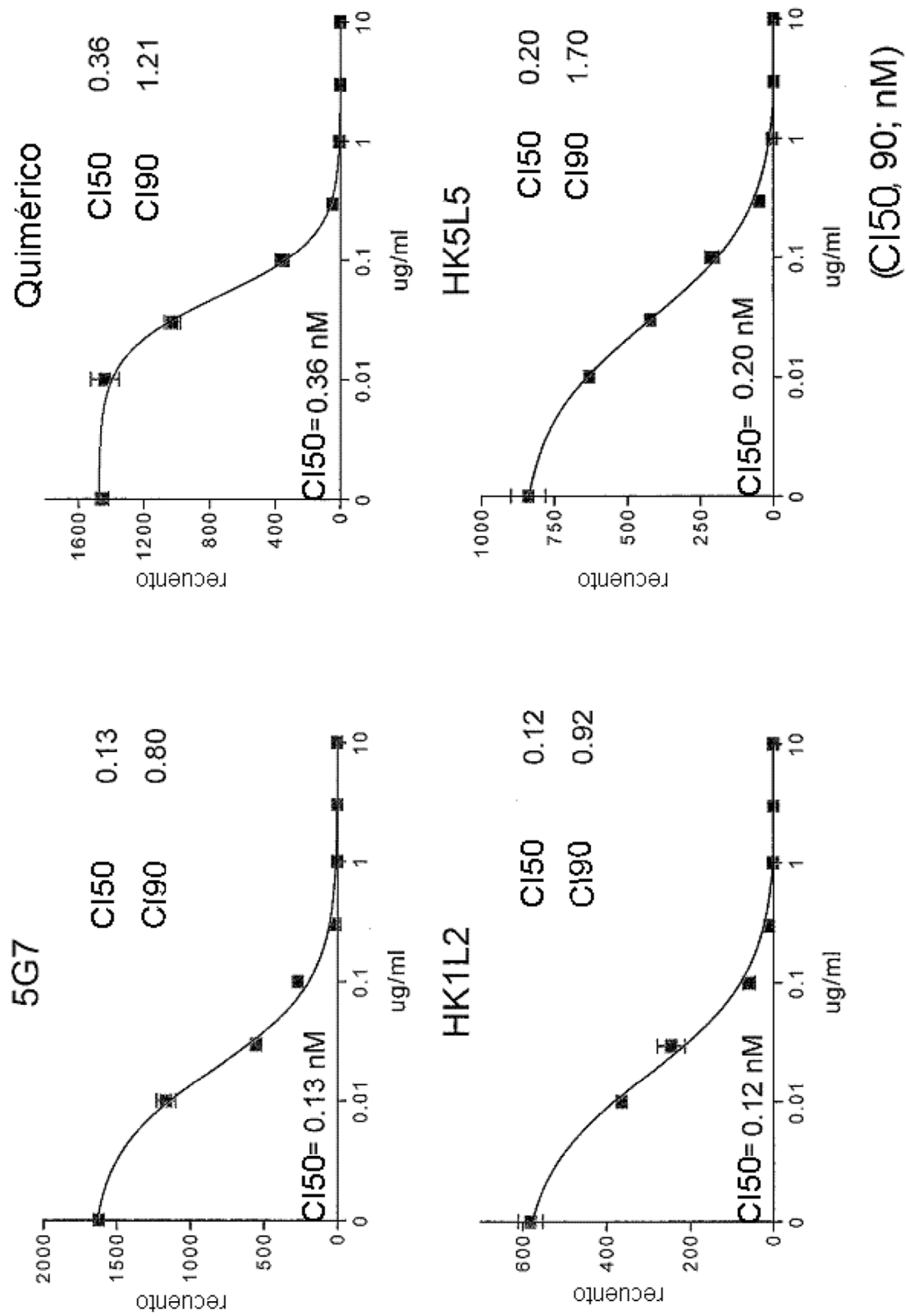
HK5L5



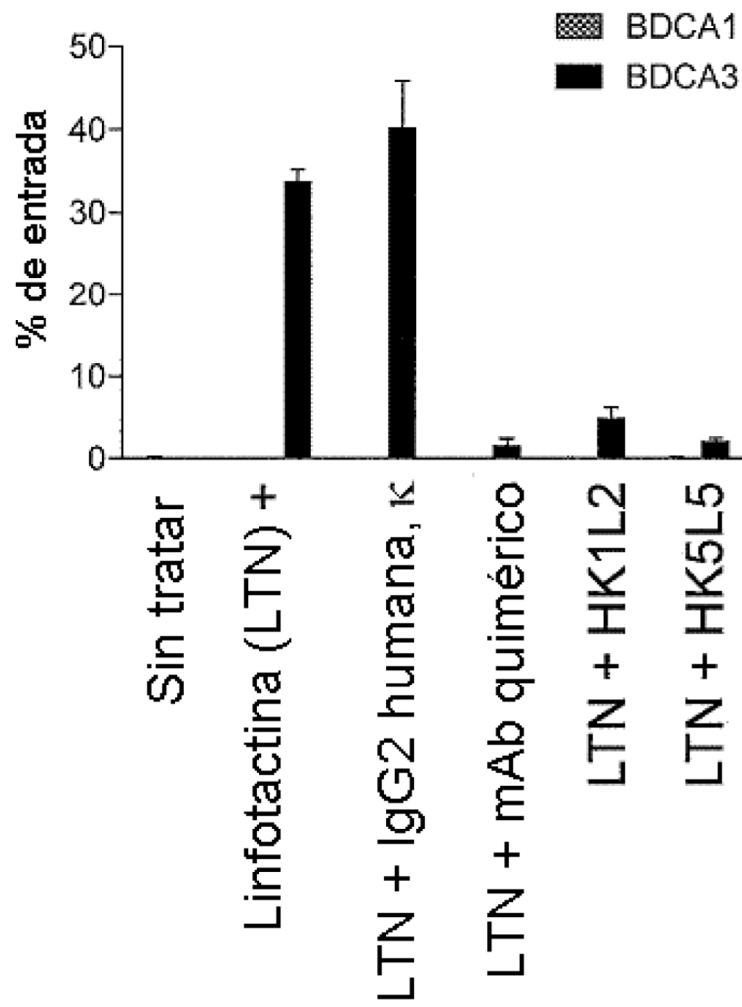
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



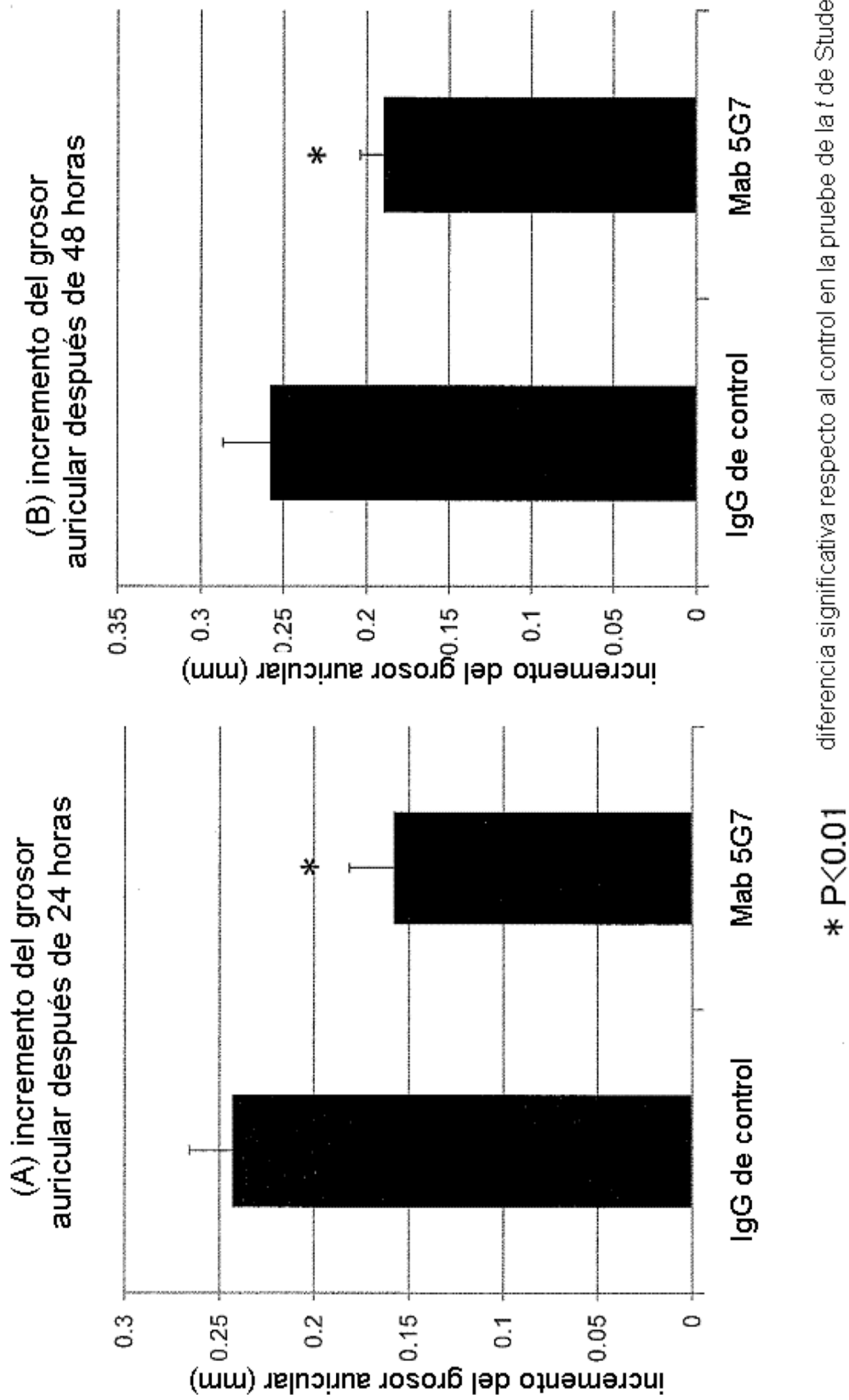
[Fig. 7]

```

<VH CDRs>
CDR1
5G7 :SHNLH (SEQ ID No: 17)
2H6 :SHNMH (SEQ ID No: 29)
11H2:DYYVN (SEQ ID No: 41)
      SHNXH (Seq ID No: 53)
CDR2
5G7 :AIYPGNGNTAYNQKFKG (SEQ ID No: 18)
2H6 :AIYPGKGNTSYNQKFKG (SEQ ID No: 30)
11H2:VSNPKNGDKSYNQKFKG (SEQ ID No: 42)
      AIYPGXGNTXYNQKFKG (Seq ID No: 54)
CDR3
5G7 :WGSVVGDW•YFDV (SEQ ID No: 19)
2H6 :WGSVVGDW•YFDV (SEQ ID No: 31)
11H2:GLYYAGTYGYFDV (SEQ ID No: 42)
      WGSVVGDW•YFDV (SEQ ID No: 55)
<VL CDRs>
CDR1
2H6 :RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID No: 20)
5G7 :RSSLGLVHRNGNTYLH (SEQ ID No: 32)
11H2:RASQDISNYLN      (SEQ ID No: 44)
      RSSXXLVHXNGNTYLH (SEQ ID No: 56)
CDR2
5G7 :KVSHRFS (SEQ ID No: 21)
2H6 :RVSNRFS (SEQ ID No: 33)
11H2:YTSRLHS (SEQ ID No: 45)
      XVSXRFS (SEQ ID No: 57)
CDR3
5G7 :SQSTHVPWT (SEQ ID No: 22)
2H6 :SQSTFVPWT (SEQ ID No: 34)
11H2:QQGKTLPRP (SEQ ID No: 46)
      SQSTXVPWT (SEQ ID No: 58)

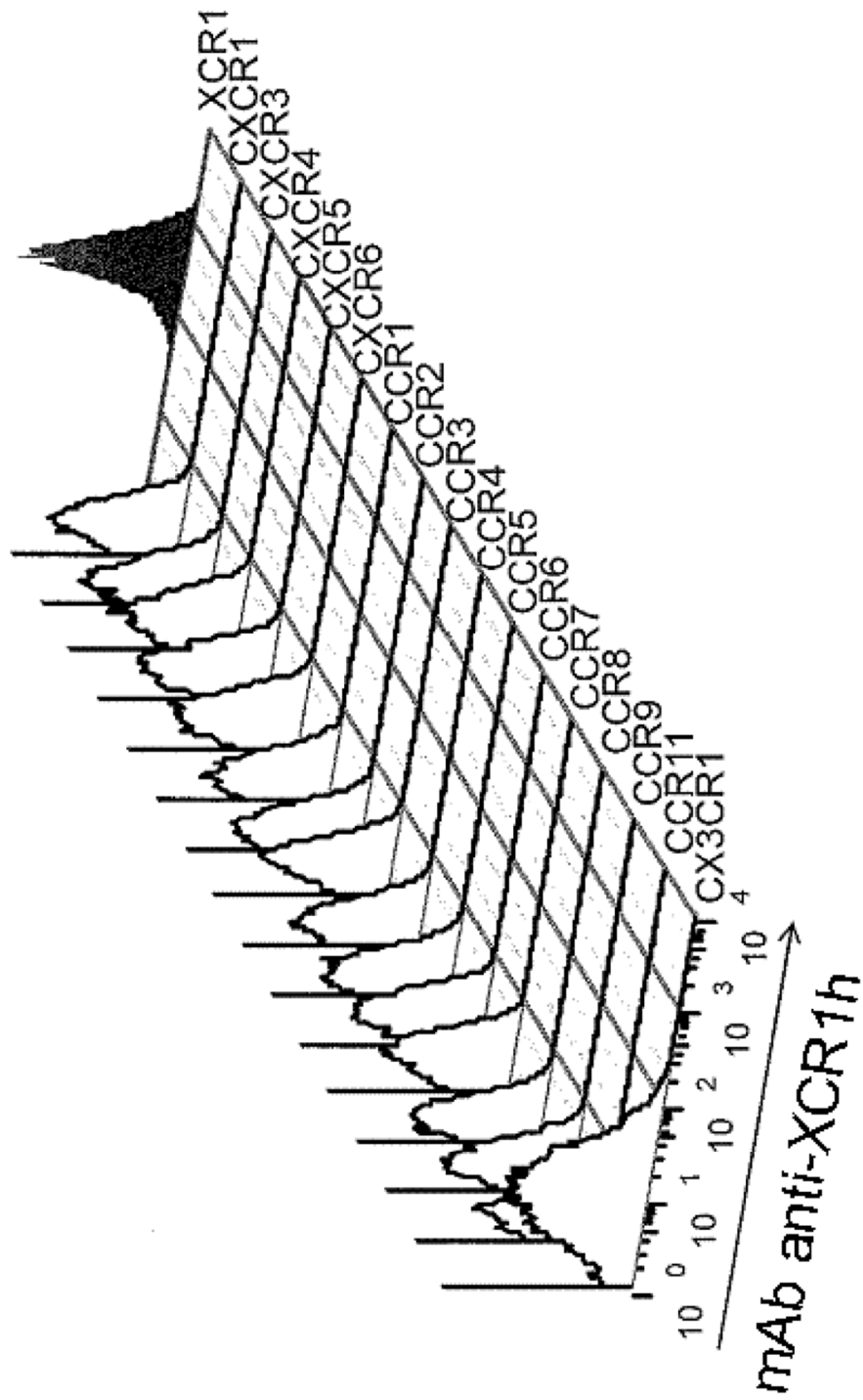
```

[Fig. 8]



[Fig. 9]

mAb anti-XCR1h (5G7)



[Fig. 10]

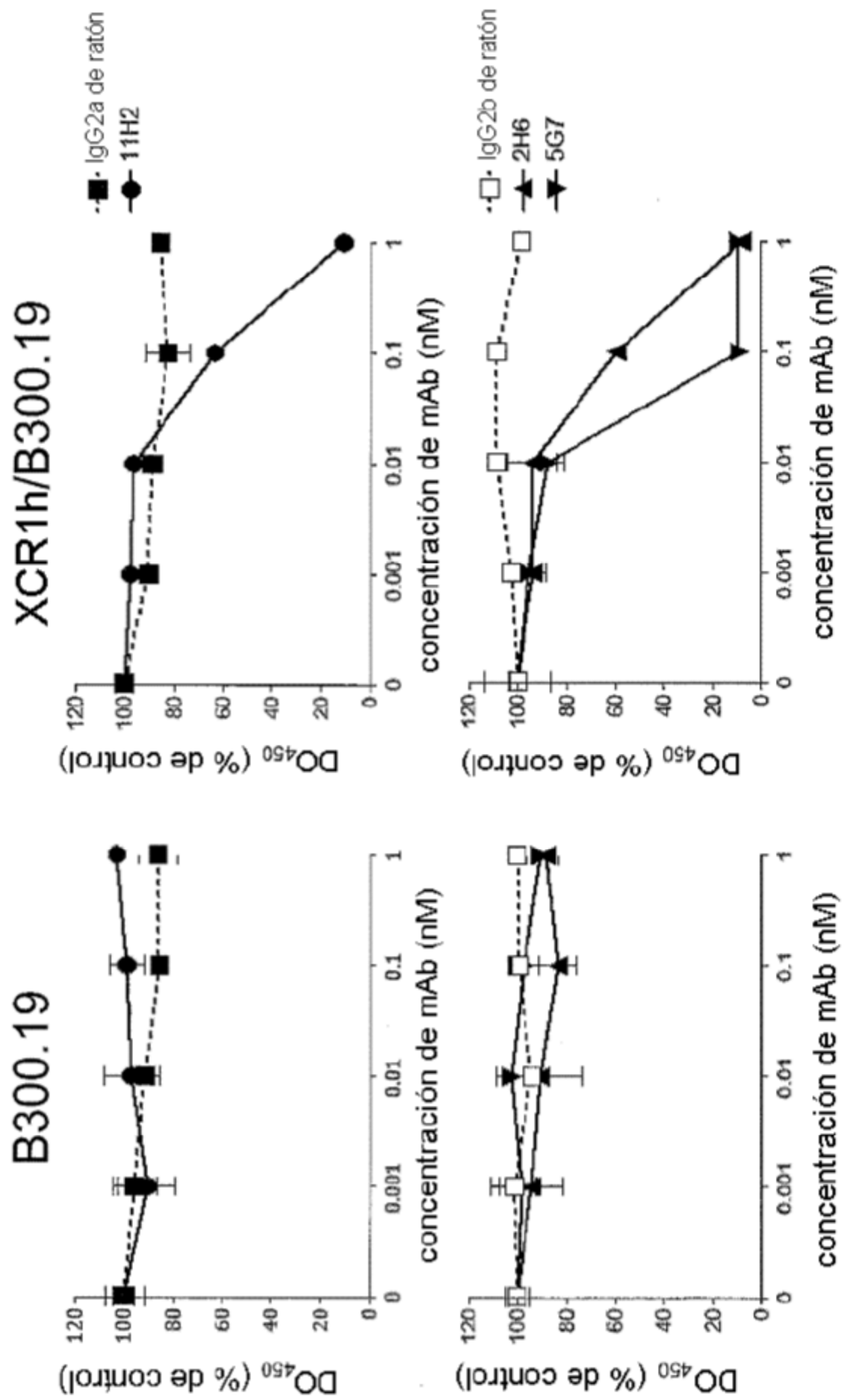
```

<211> 333
<212> PRT
<213> Abramis brama

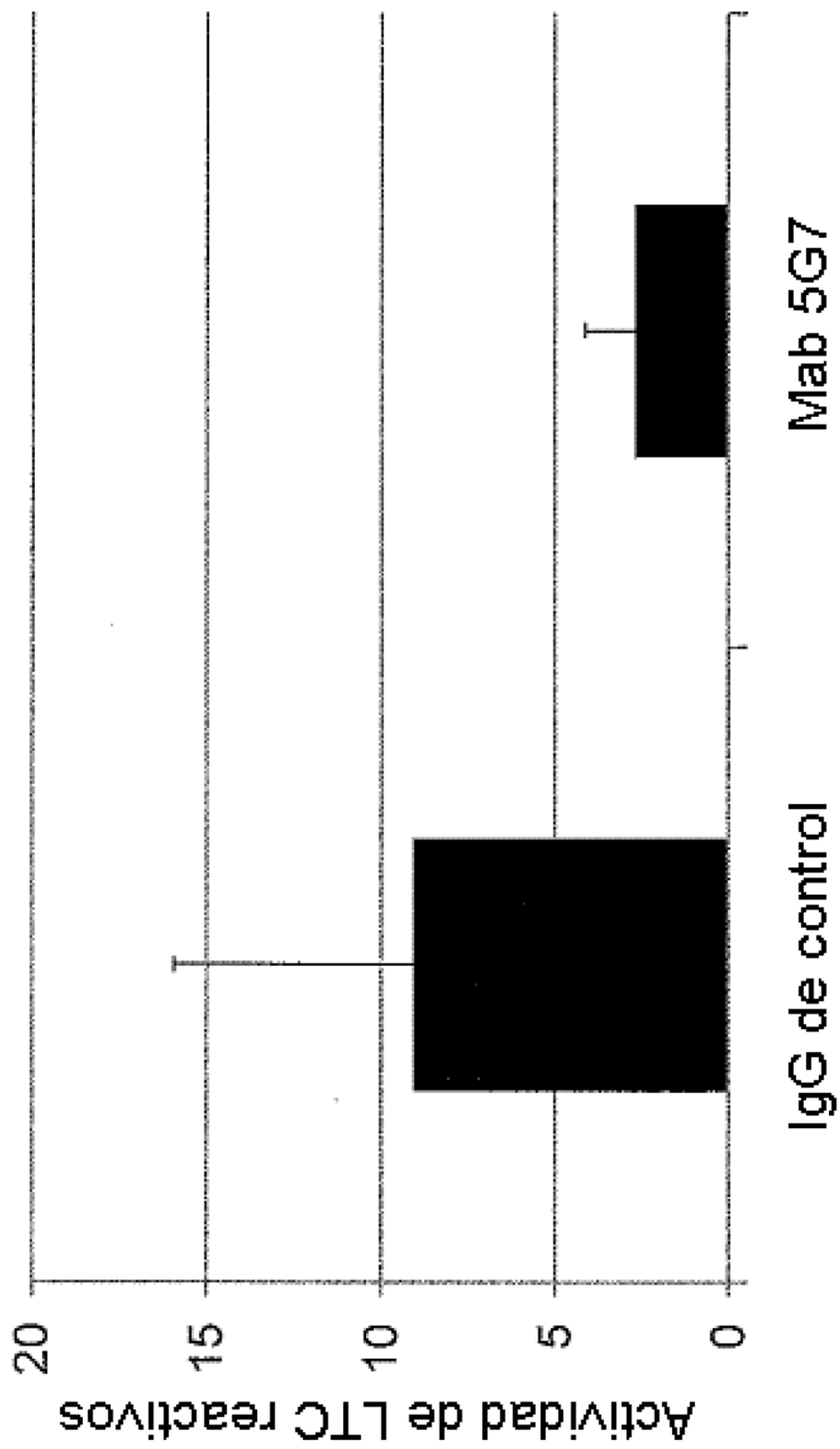
Met Glu Ser Ser Gly Asn Pro Glu Ser Thr Thr Phe Phe Tyr Tyr Asp
1      5      10      15
Leu Gln Ser Gln Pro Cys Glu Asn Gln Ala Trp Val Phe Ala Thr Leu
      20      25      30
Ala Thr Thr Val Leu Tyr Cys Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Val Gly
      35      40      45
Asn Ser Leu Val Leu Trp Val Leu Val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

```

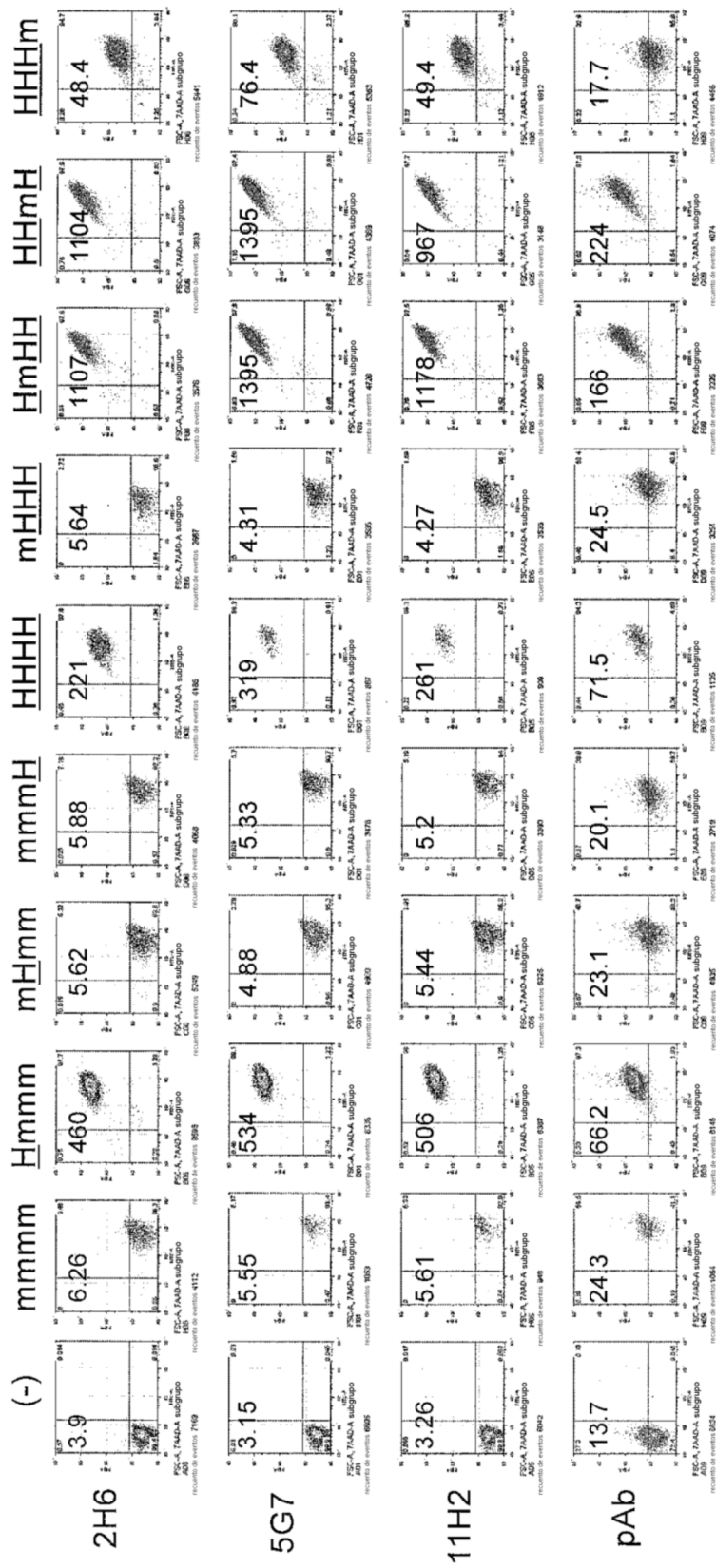
[Fig.11]



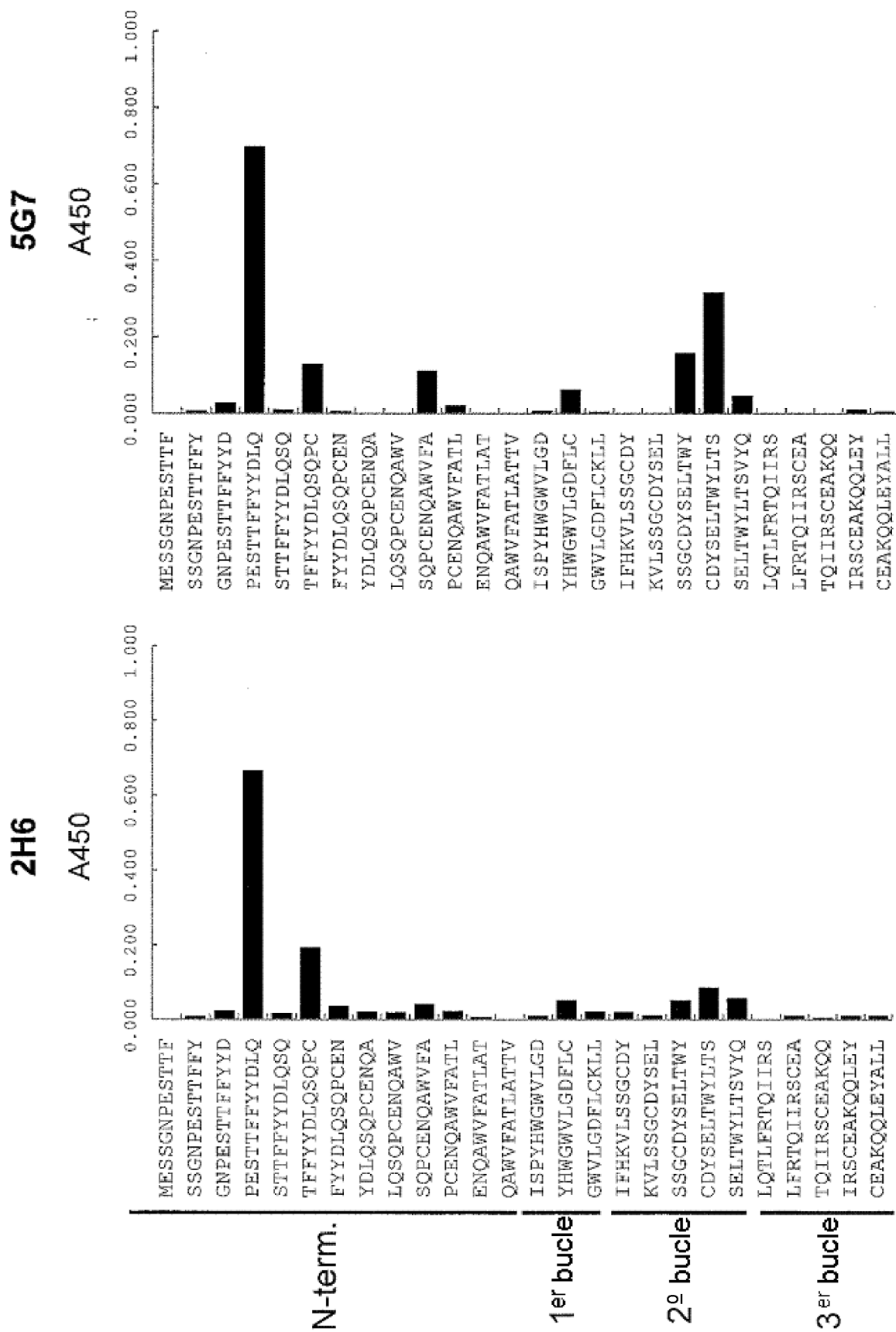
[Fig. 12]



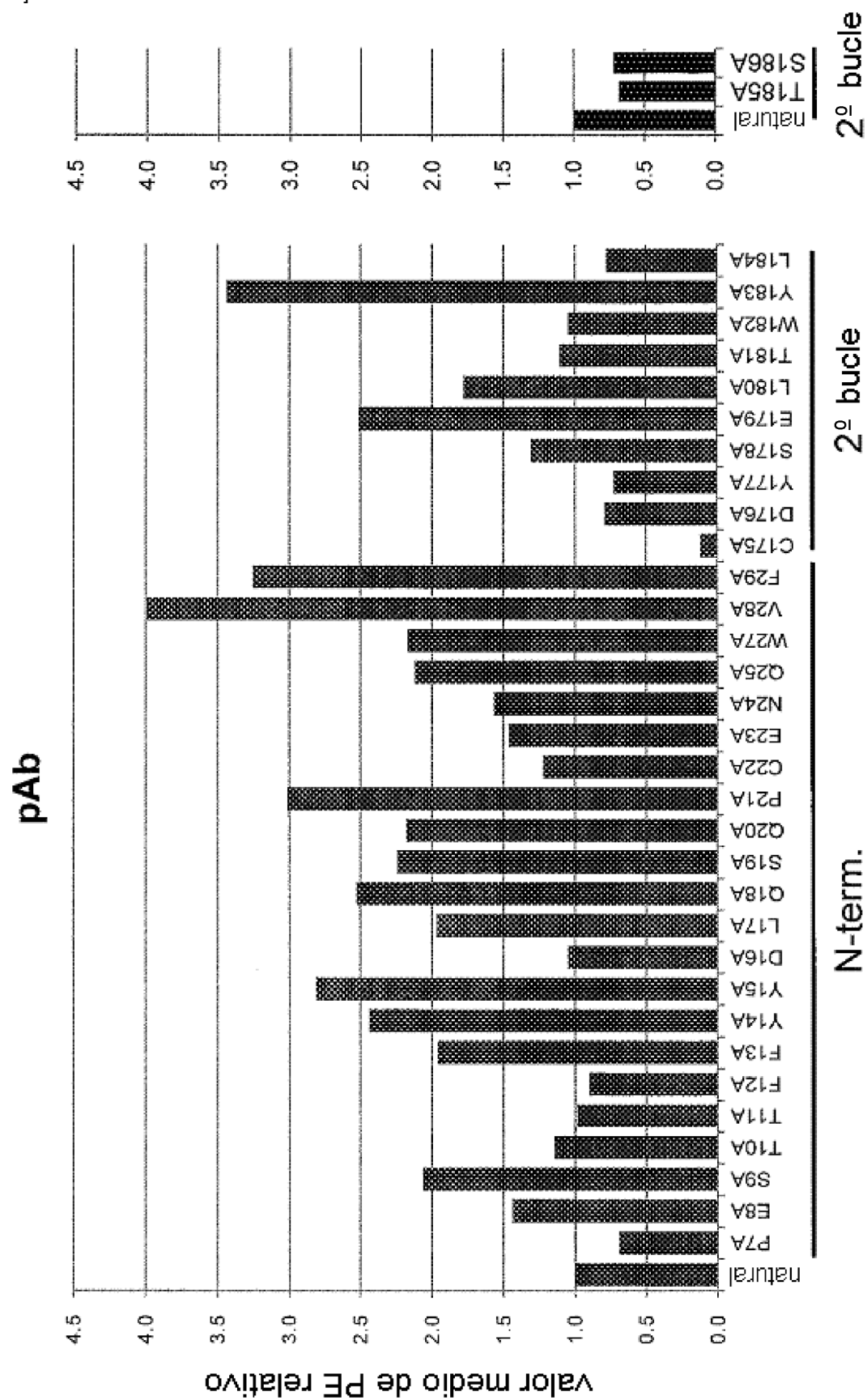
[Fig. 13]



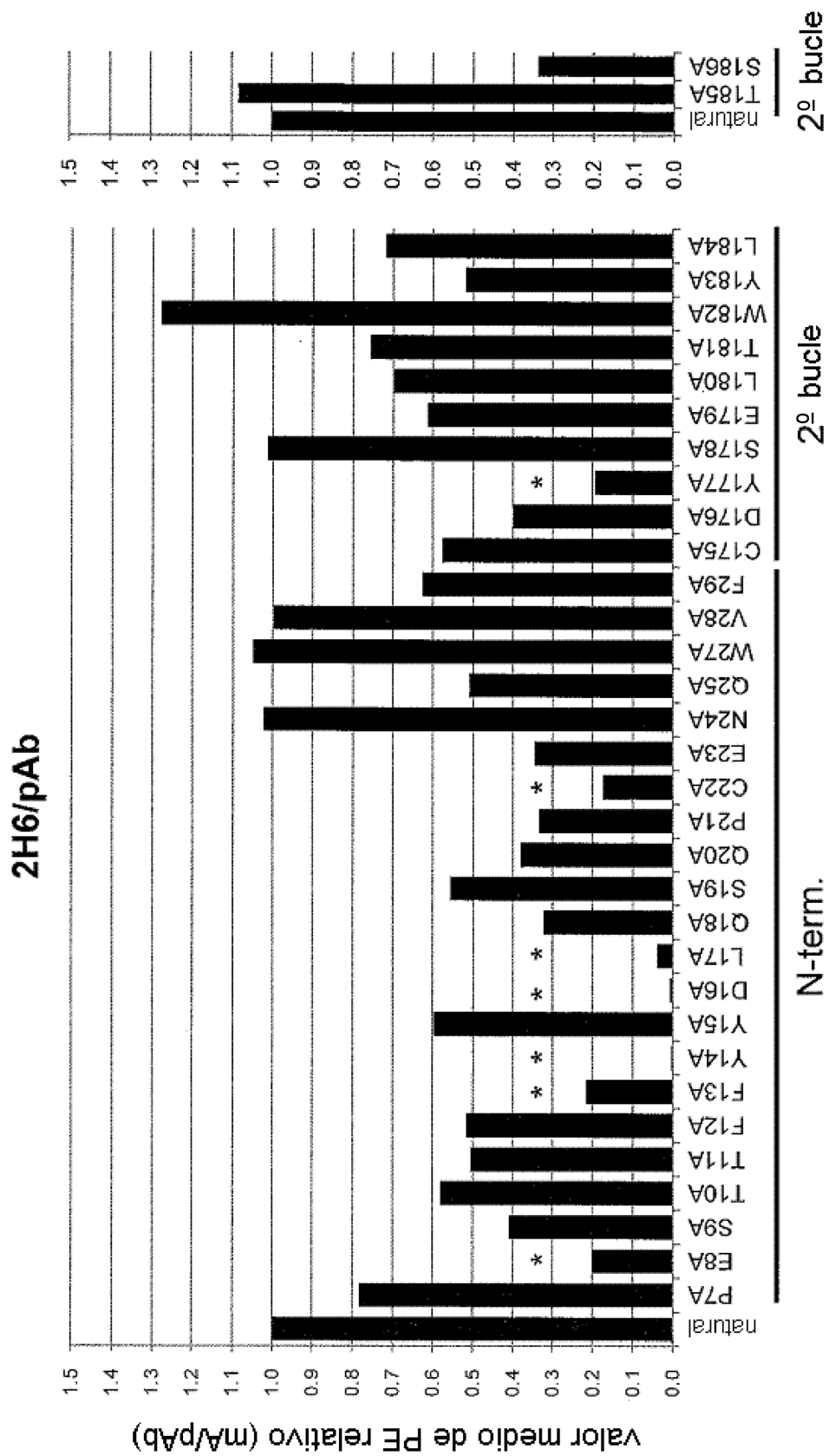
[Fig. 14]



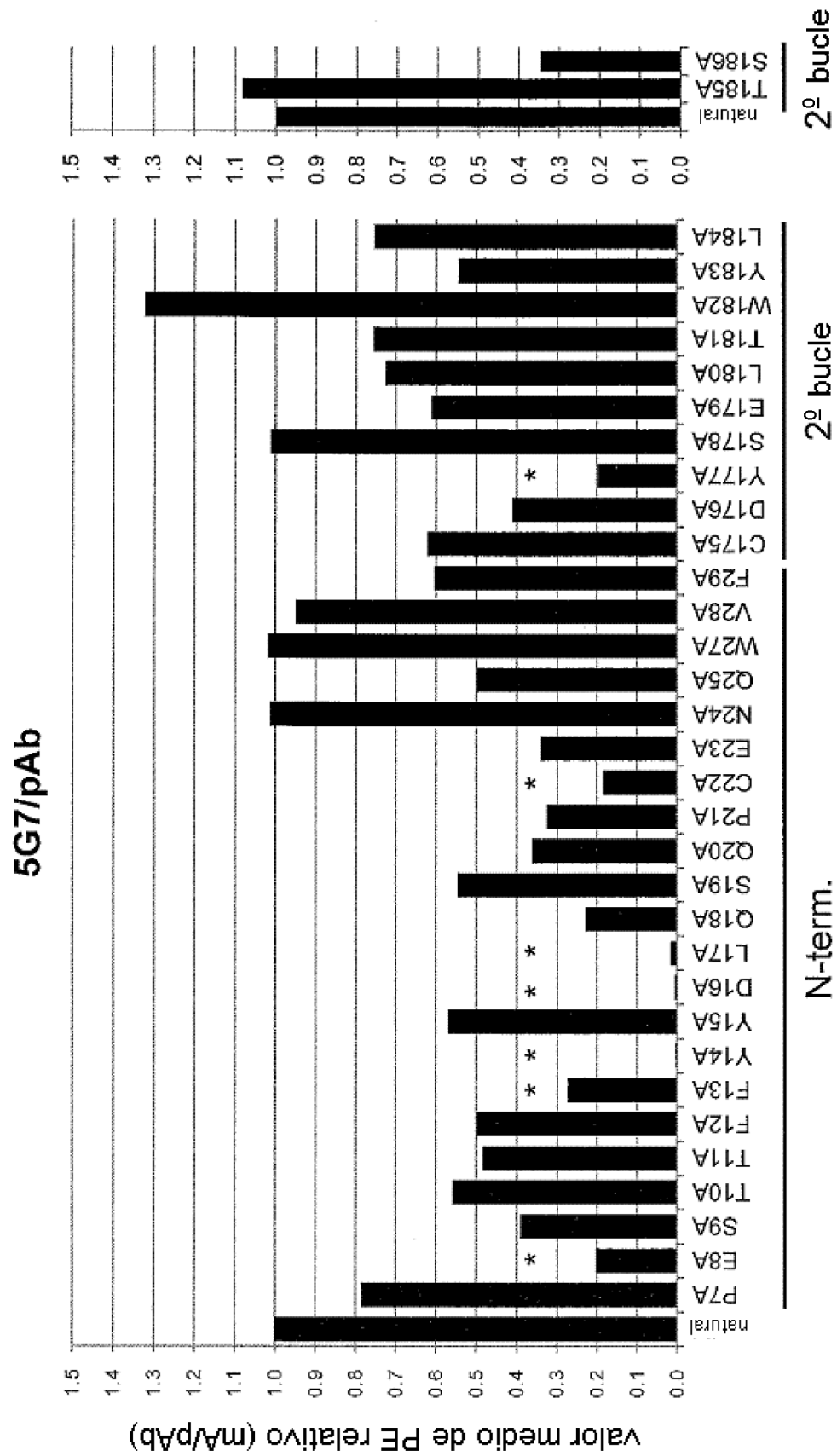
[Fig. 15]



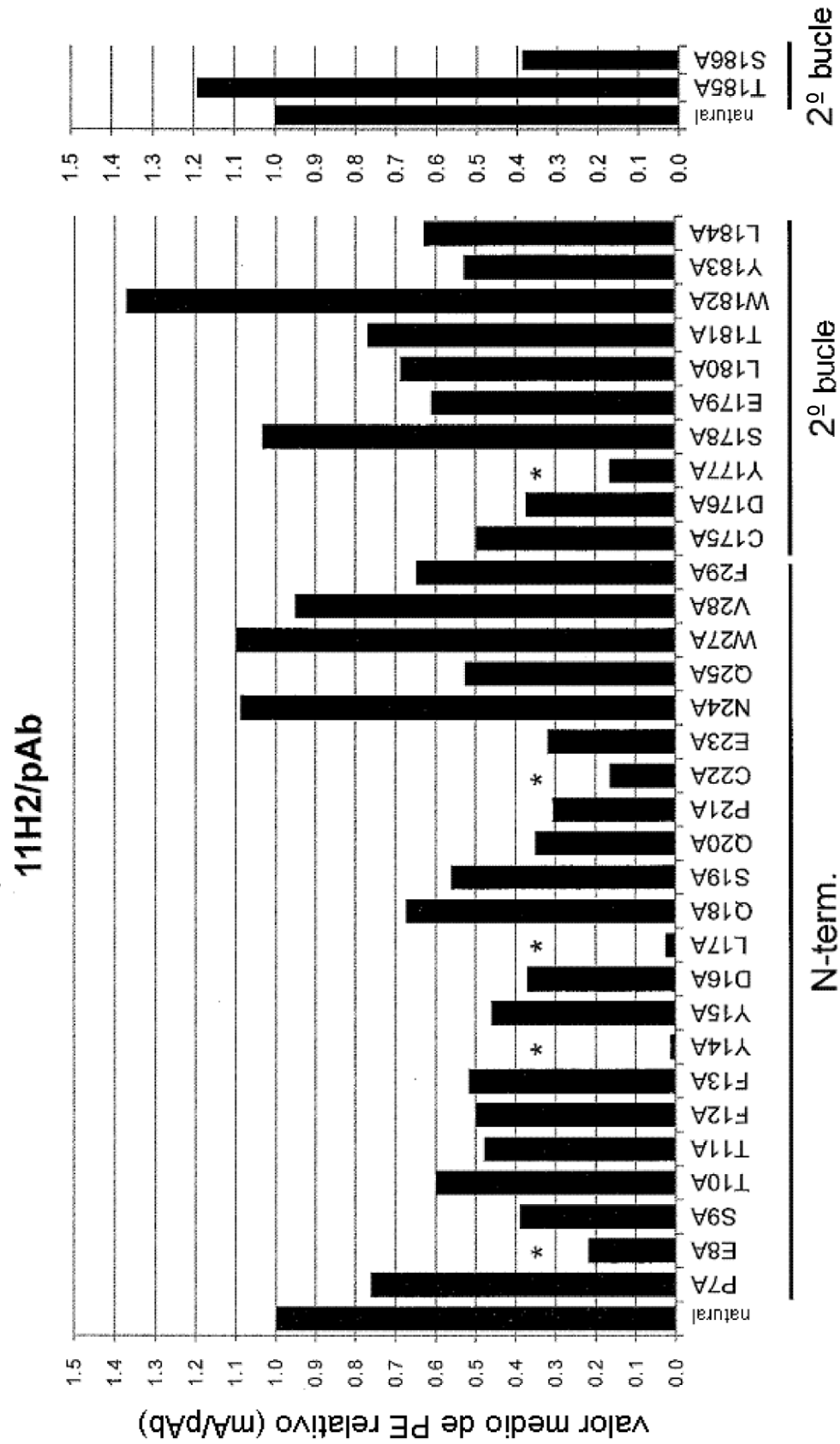
[Fig. 16]



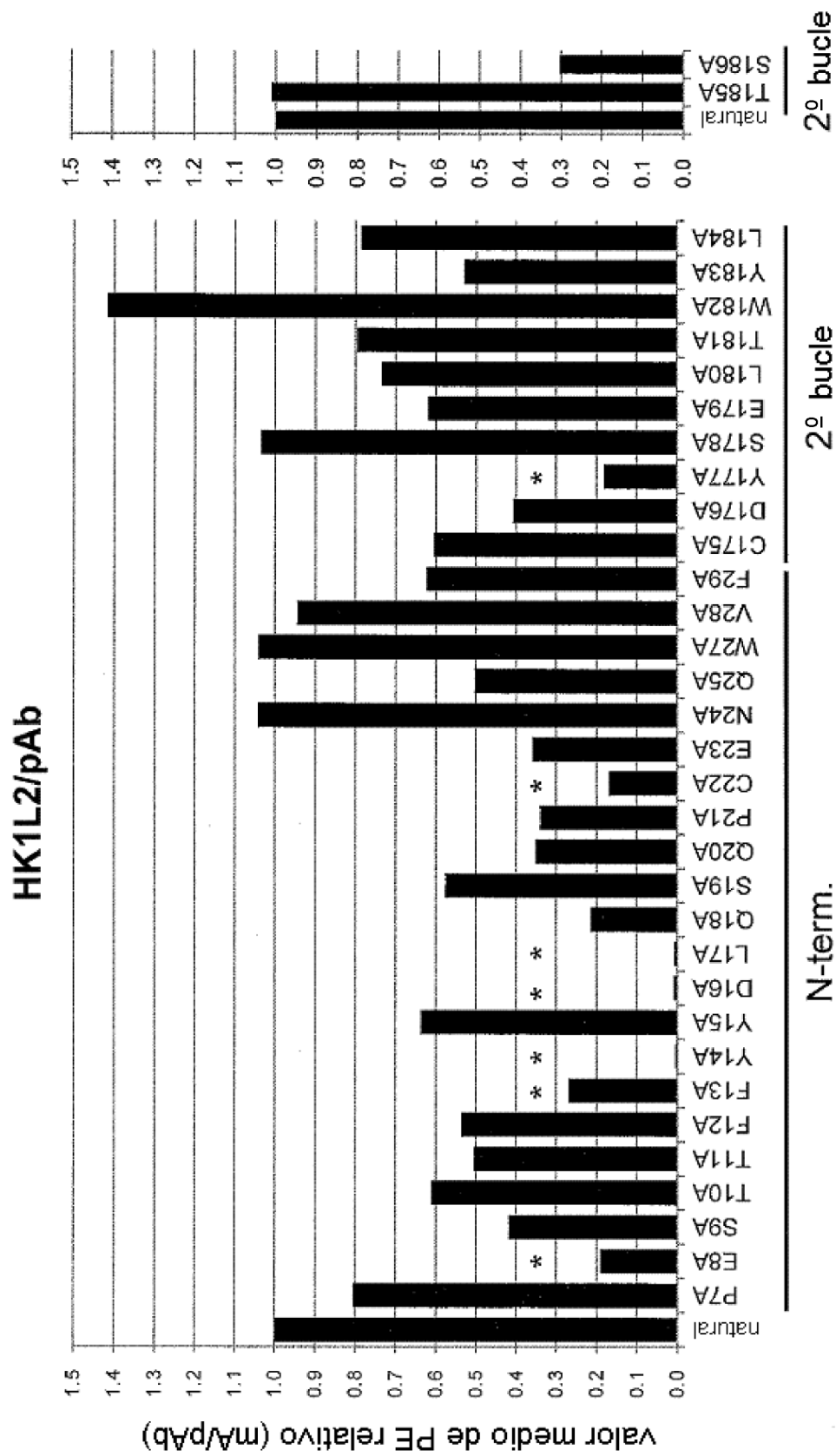
[Fig. 17]



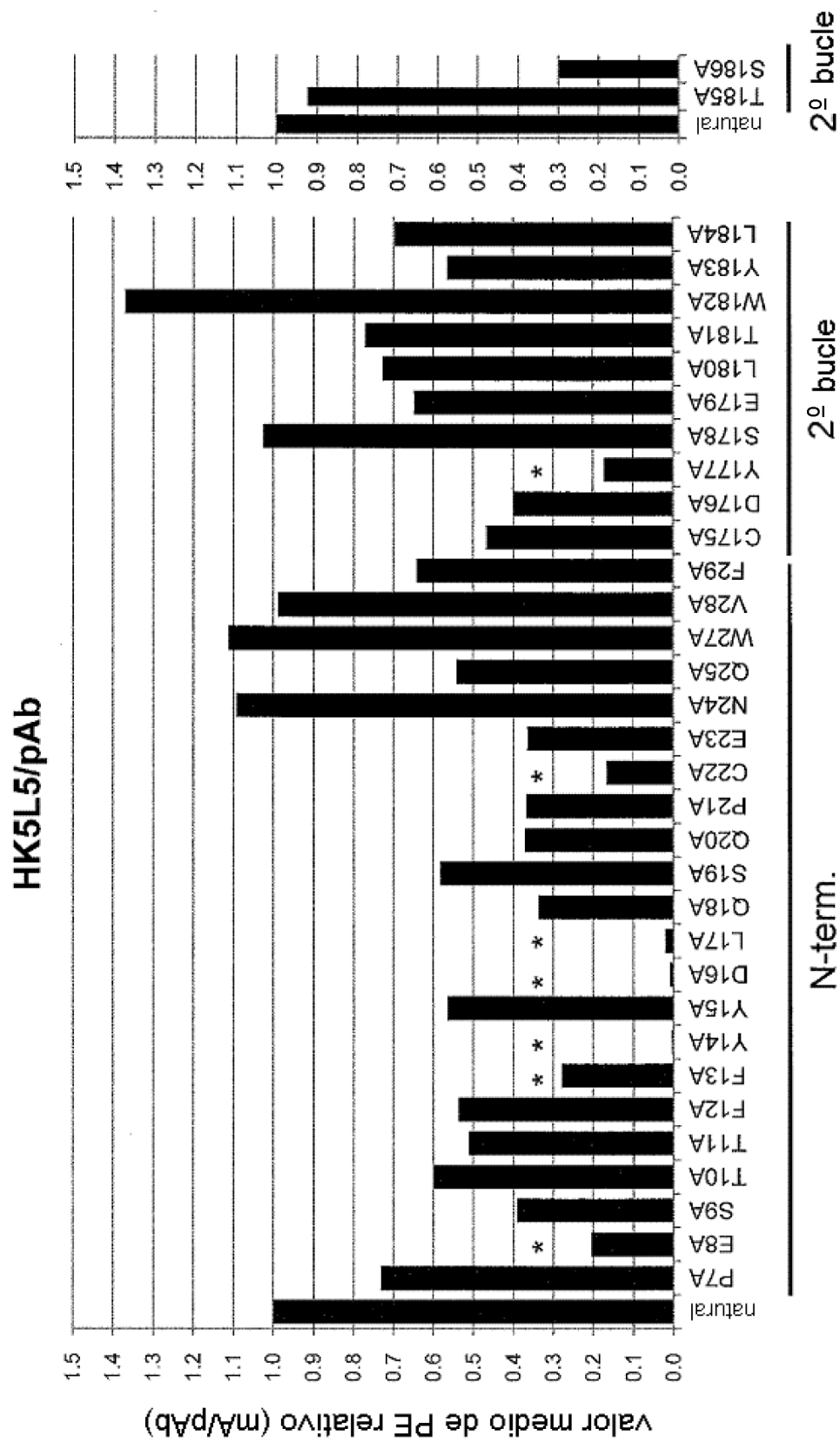
[Fig. 18]



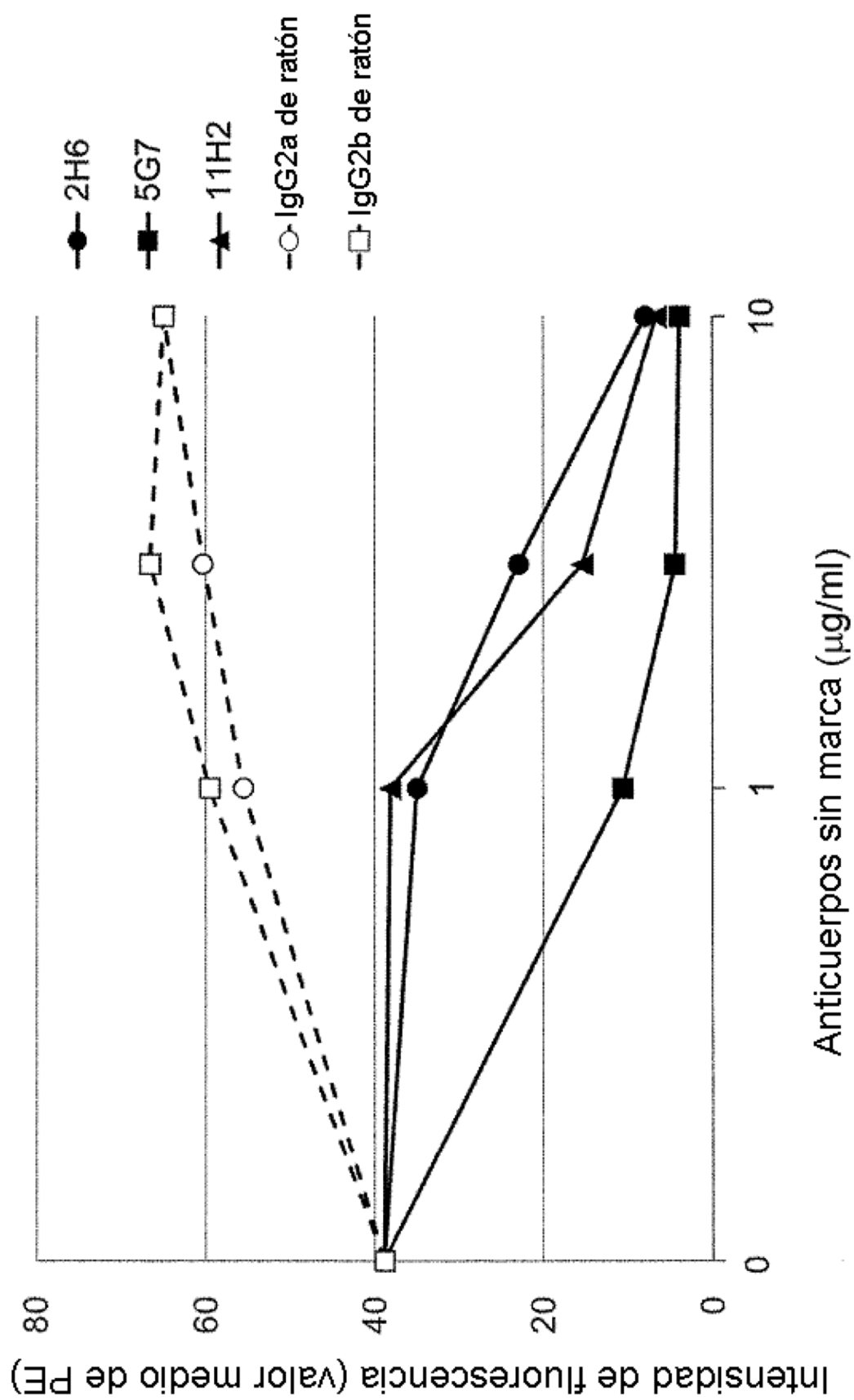
[Fig. 19]



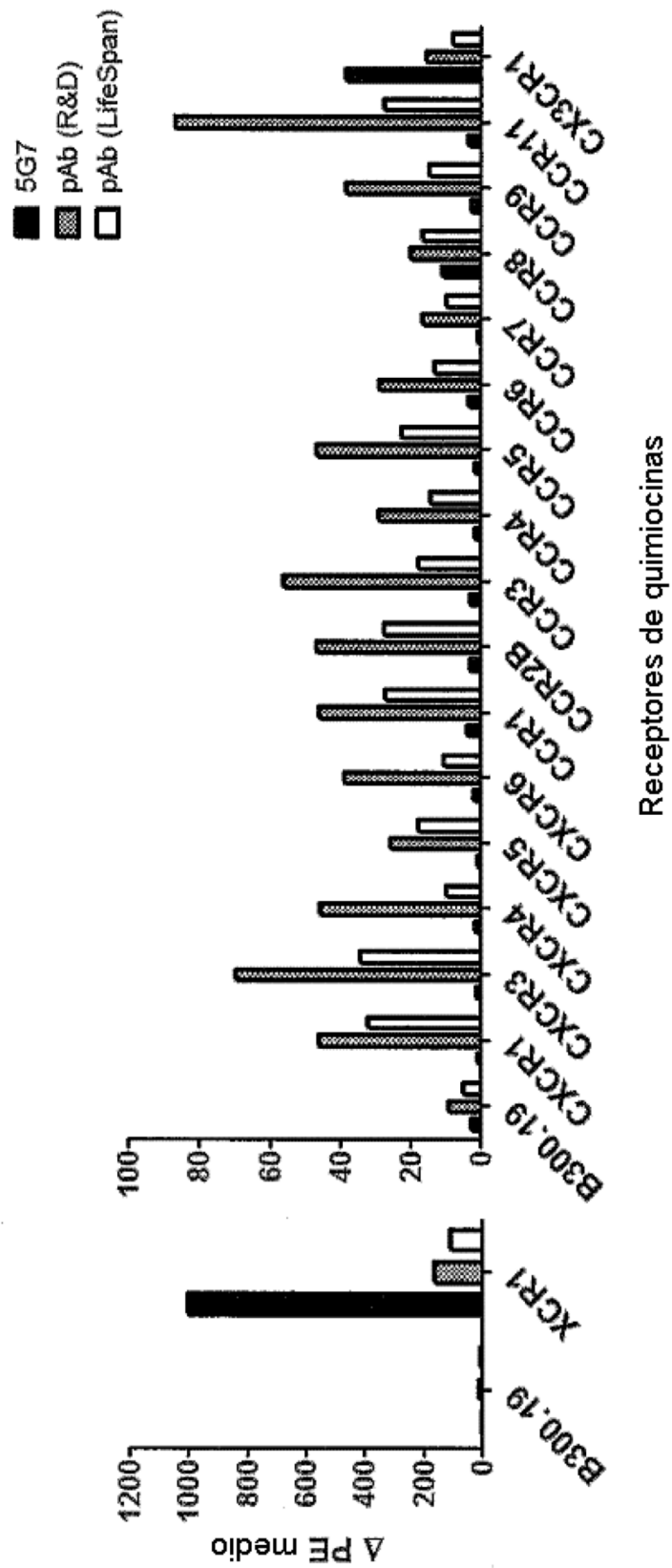
[Fig. 20]



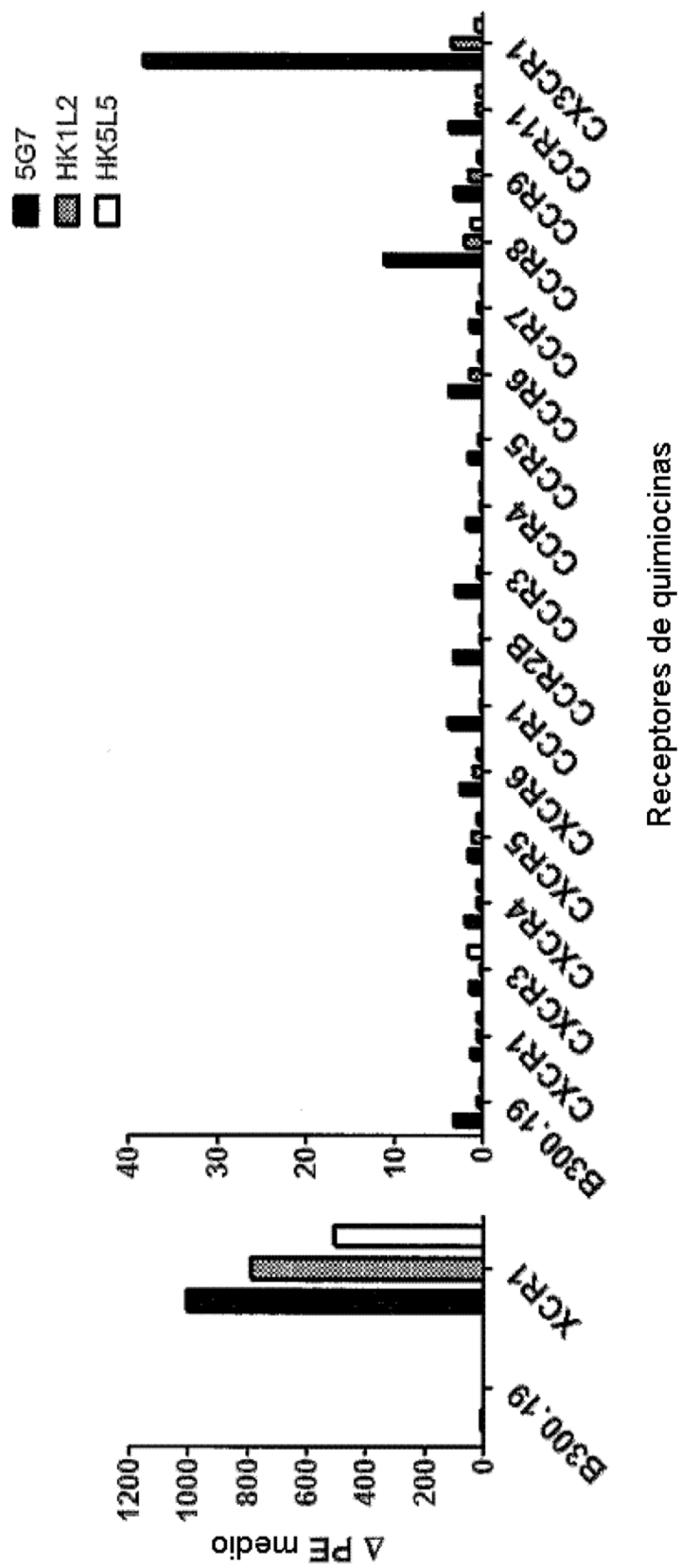
[Fig. 21]



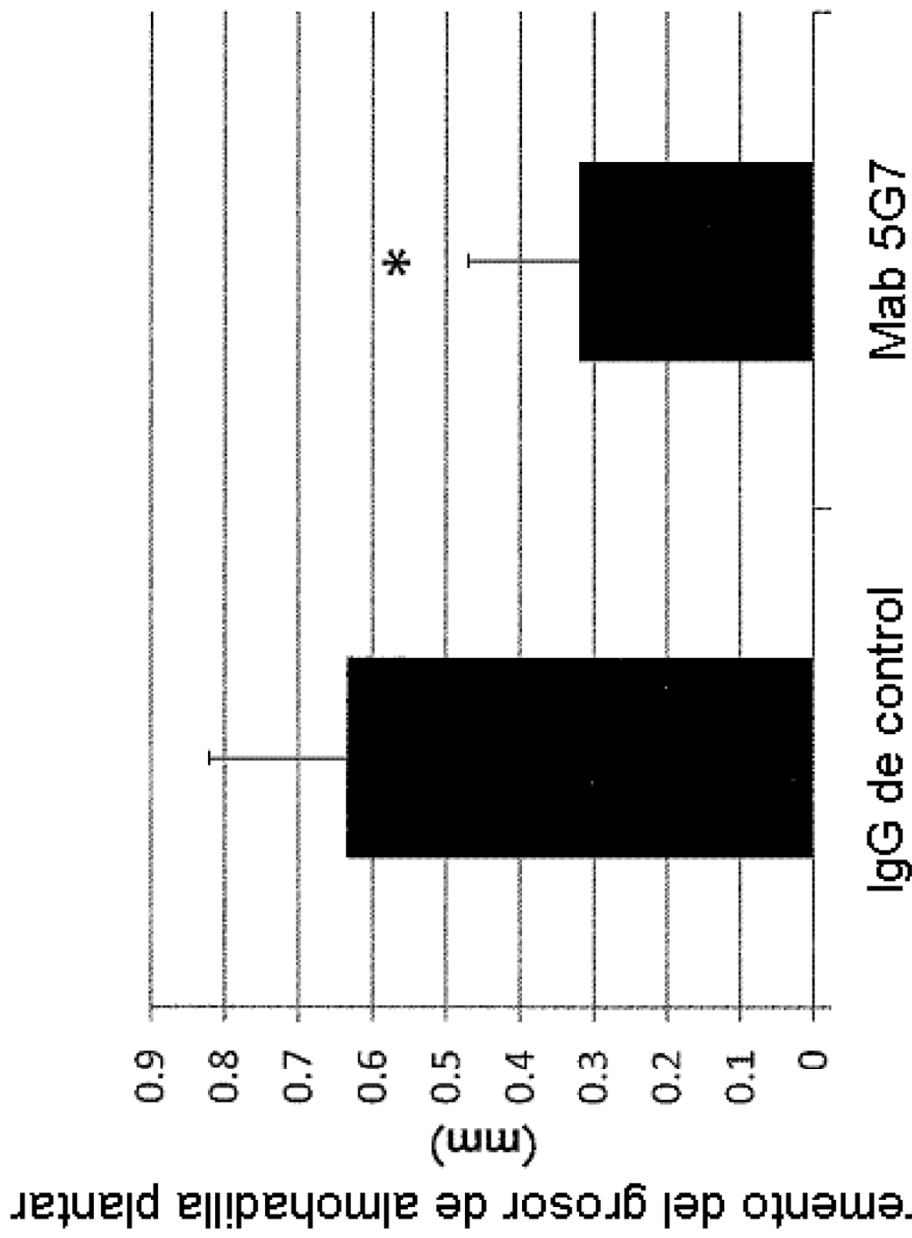
[Fig. 22]



[Fig. 23]

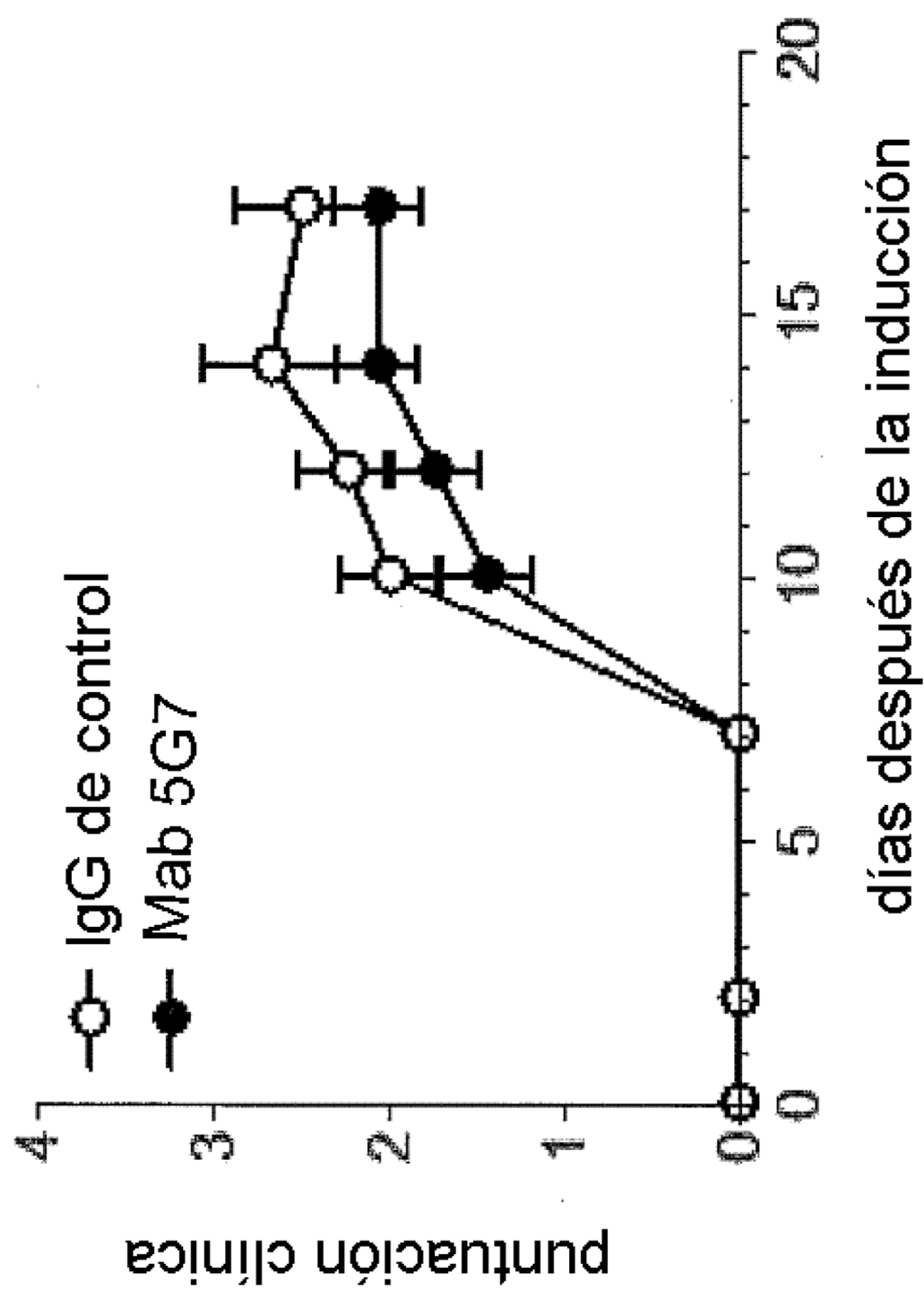


[Fig. 24]



* $P < 0.05$ diferencia significativa respecto al control en la prueba de la *t* de Student

[Fig. 25]



[Fig. 26]

