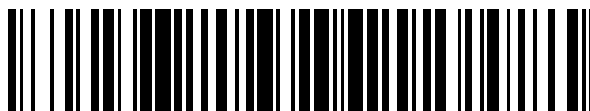


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 606**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2013** **PCT/US2013/022280**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013** **WO13109974**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2013** **E 13702548 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** **EP 2804878**

54 Título: **Anticuerpos anti-CXCR3**

30 Prioridad:

20.01.2012 US 201261588936 P

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

05.02.2019

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

YOUD, MICHELE;
TEDSTONE, JENNIFER;
LODIE, TRACEY;
CARTER, KAREN, B.;
CONNORS, TIMOTHY, D.;
PINCKNEY, JASON, ROBERT;
MASTERJOHN, ELIZABETH y
CHU, RUIYIN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 698 606 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-CXCR3

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad en virtud del título 35 del Código de los Estados Unidos, artículo 119, de la solicitud provisional de los EE. UU. n.º 61/588.936, presentada el 20 de enero de 2012.

5 Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se ha presentado en formato ASCII a través de EFS-Web. Dicha copia ASCII, creada el 28 de enero de 2013, lleva el nombre 12423304.txt y tiene un tamaño de 307.524 bytes.

10 La invención se refiere a anticuerpos y métodos para usar los anticuerpos para tratar trastornos asociados a la señalización de CXCR3, tal como la diabetes mellitus tipo 1 (diabetes tipo I; T1D).

La diabetes se caracteriza por una hiperglucemia crónica que resulta de la falta de acción de la insulina, junto con diversas anomalías metabólicas características. La diabetes se puede dividir en general en tipo I y tipo II. La T1D se caracteriza por la pérdida de las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans, mientras que la diabetes tipo II se caracteriza por reducciones en la secreción de insulina y en la sensibilidad a la insulina (resistencia a la insulina).
15 En los Estados Unidos, la prevalencia de la diabetes es de aproximadamente 2 a 4 por ciento de la población, donde la diabetes tipo I (también conocida como insulino dependiente o IDDM, por sus siglas en inglés) representa aproximadamente 7 a 10 por ciento de todos los casos.

La diabetes tipo I se caracteriza por la incapacidad de producir suficiente insulina para mantener la homeostasis de la glucosa. Se cree que la causa de este trastorno es la destrucción autoinmunitaria de las células β pancreáticas. La autoinmunidad asociada a la diabetes tipo I implica la participación de linfocitos autorreactivos B y T. De hecho, hasta el 98 % de los pacientes con diabetes tipo I tiene anticuerpos contra uno o más de sus propios antígenos de células β , incluidos insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés), antígeno de insulinoma 2 y antígeno de insulinoma 2b (IA-2 e IA-2 β) y los antígenos citoplasmáticos de células del islote heterogéneos (ICA, por sus siglas en inglés). Aunque no siempre puede ser determinante, el nivel de uno o más autoanticuerpos
20 generalmente se correlaciona con el estado de destrucción de las células β . Irvine, et al., Diabetes, 26:138-47 (1997); Riley, et al., N. Engl. J. Med., 323:1167-72 (1990). Por consiguiente, los autoanticuerpos pueden servir como indicadores del desarrollo de la diabetes autoinmunitaria y junto con cambios metabólicos pueden predecir el riesgo de desarrollar diabetes en parientes de pacientes con T1D.

El desarrollo de la diabetes tipo I puede estar mediado por linfocitos T autorreactivos, como lo indican las biopsias de tejido obtenidas alrededor del momento del diagnóstico de T1D que muestran los islotes infiltrados con linfocitos T activados. Bottazzo et al., N. Engl. J. Med., 313:353-60 (1985); Hanninen et al., J. Clin. Invest., 90:1901-10 (1992); Itoh et al., J. Clin. Invest., 92:2313-22 (1993); Imagawa, et al., Diabetes, 50:1269-73 (2001).

El receptor de quimiocina (motivo C-X-C) 3 (CXCR3), también conocido como receptor acoplado a la proteína G 9 (GPR9, por sus siglas en inglés), CD183, receptor de IP-10 y receptor de Mig, es un receptor de quimiocina expresado en linfocitos T autorreactivos que se han relacionado con una gama de procesos fisiológicos y trastornos relacionados, tales como la T1D. El CXCR3 está ausente en gran medida en linfocitos T indiferenciados, pero aumenta tras la activación con el antígeno y reúne a células activadas en sitios de inflamación tisular en respuesta a sus ligandos primarios: CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Se ha demostrado que las células β expresan predominantemente CXCL10, con niveles más bajos de CXCL9, en modelos de T1D en ratón (Christen et al. The Journal of Immunology, 2003, 171: 6838-6845; Morimoto et al. J Immunol 2004;173:7017-7024; Sarkar et al. Diabetes. 2012 Feb;61(2):436-46); y en islotes de pacientes con T1D que padecen insulitis (Uno et al 2010; Roep et al. Clinical and Experimental Immunology, 2003, 159: 338-343; Sarkar et al. Diabetes. 2012 Feb;61(2):436-46). Además, se ha demostrado que los linfocitos T que han infiltrado el páncreas expresan CXCR3 en modelos de T1D en ratones y muestras de páncreas de pacientes con diabetes tipo 1 (Christen et al, The Journal of Immunology, 2003, 171: 6838-6845; Van Halteren et al., Diabetologia 48:75-82 (2005); Uno et al 2010; Roep et al., Clinical and Experimental Immunology, 2003, 159: 338-343; Sarkar et al., Diabetes. 2012 Feb;61(2):436-46). Además, los ratones con genes inactivados con CXCR3 deficiente demuestran un retraso significativo en la aparición de la T1D y una reducción en su incidencia (Frigerio et al., Nature Medicine 8:1414-1420 (2002)), mientras que la sobreexpresión de CXCL10 en los islotes de ratones transgénicos promueve la infiltración por linfocitos T y acelera la aparición de la T1D (Rhode et al., J. Immunol. 175(6): 3516-24 (2005)). Se ha demostrado que la neutralización de CXCL10 mediante tratamiento con anticuerpos es protectora (Christen et al., The Journal of Immunology, 2003, 171: 6838-6845).

Existen tres isoformas de CXCR3, indicadas como A, B y Alt., que se han identificado en humanos (Lasagni et al. J. Exp. Med. 2003 197:1537; Ehler et al J. Immunol. 2004;173:6234-6240). El CXCR3-A se une a las quimiocinas CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) y CXCL11 (I-TAC); CXCR3-B también se une a estas dianas, pero también se une a CXCL4; CXCR3-Alt parece interactuar con CXCL11. Aunque el empalme alternativo conduce a la generación de diversas isoformas proteicas de CXCR3, CXCR3-A es la forma predominante in vivo, dado que CXCR3-B y CXCR3-

Alt se expresan a niveles mucho más bajos a los niveles proteicos. Lasagni et al. J. Exp. Med. 2003 197:1537; Ehlert et al J. Immunol. 2004;173:6234-6240.

Los esfuerzos para interrumpir la vía de CXCR3 mediante el uso de inhibidores de molécula pequeña de CXCR3 no han demostrado ser completamente eficaces. Christen et al., Clin Exp. Immunol. 165: 318-328 (2011). Por consiguiente, la investigación se ha centrado en anticuerpos y otros métodos para interrumpir CXCL10, principalmente antes de la aparición de la diabetes. Morimoto et al., J. Immun. 173: 7017-7024 (2004); Oikawa et al., Rev. Diabet. Stud. 7: 209-224 (2010).

La solicitud internacional WO 2005/030793 describe anticuerpos anti-CXCR3 humano monoclonales humanos, 5H7 y 7H5.

La solicitud internacional WO 01/72334 describe el anticuerpo anti-CXCR3 de ratón monoclonal de rata 1G3.

La solicitud internacional WO 2008/094942 describe anticuerpos anti-CXCR3 humano humanizados, incluido el mAb anti-CXCR3 humano de ratón humanizado V44D7.

La patente estadounidense n.º US 6.184.358 describe anticuerpos monoclonales murinos (de ratón) contra CXCR3 humano, incluido en particular 1C6.

En virtud de la prevalencia de la T1D y otros trastornos en los que está implicado CXCR3, existe la necesidad de métodos adicionales dirigidos a la señalización de CXCR3, p. ej., para tratar o reducir la progresión de un trastorno tal como T1D en un paciente.

En la presente se describen anticuerpos y métodos para usar los anticuerpos que son capaces de unirse a CXCR3. En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden usar para prevenir, tratar o reducir la progresión temprana de la T1D en un sujeto al dirigirse a la vía de CXCR3. Los anticuerpos y métodos dependen, al menos en parte, del sorprendente resultado de que anticuerpos neutralizantes dirigidos a CXCR3 pueden prevenir la aparición de la T1D en ratones NOD cuando se administran antes de la aparición de la enfermedad, o pueden revertir la evolución de la enfermedad cuando se administran en la fase de aparición reciente de la T1D en ratones NOD. Además, la neutralización de la actividad de CXCR3 no se asocia con una alteración significativa del funcionamiento normal del sistema inmunitario del paciente, lo que reduce, de esta manera, los efectos secundarios indeseables del tratamiento con anticuerpos.

Por consiguiente, en un aspecto, en la presente memoria se describen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno capaces de neutralizar la actividad de CXCR3. En ciertas realizaciones, los anticuerpos que neutralizan CXCR3 pueden caracterizarse por la capacidad de unirse a un péptido seleccionado de los residuos 1-58, 1-16 o 1-37 de la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden clones de anticuerpo (CI) enteros o porciones designados CI 12, CI 135, CI 82, CI 53 y/o CI 4. En ciertas realizaciones, se proporcionan las variantes de anticuerpo CI 12, CI 135, CI 82, CI 53 y/o CI 4, incluidas variantes injertadas con CDR, humanizadas, retromutadas y completamente humanas de los anticuerpos descritos. En realizaciones específicas, el anticuerpo comprende una o más regiones de determinación de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), p. ej., una o más de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o una o más de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, de los clones CI 12, CI 135, CI 82, CI 53 y/o CI 4 o cualquiera de las variantes de los clones 4, 12, 53, 82 y 135 descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los anticuerpos de CI 12, CI 135, CI 82, CI 53 y/o CI 4, o las versiones quiméricas y humanizadas de estos, exhiben ciertas propiedades beneficiosas, en comparación con los clones anti-CXCR3 5H7, 7H5, V44D7, 1C6 y/o 49801. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden exhibir mayor afinidad de unión en comparación con los clones anti-hCXCR3 5H7, 7H5, V44D7, 1C6 y 49801. Por ejemplo, el anticuerpo puede exhibir afinidad 1, 2, 3, 4, 5 o más veces mejor (o cualquier valor intermedio) con respecto a los anticuerpos anti-CXCR3 tales como 1C6, p. ej., según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales (p. ej., usando un ensayo BIACORE™). Los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria también tienen una reducción prevista de la inmunogenicidad en comparación con los clones anti-hCXCR3 de ratón 5H7, 7H5, V44D7, 1C6 y 49801. Además, los clones de cadena pesada 4.7-4.11 descritos en la presente memoria se han optimizado para retirar un sitio de desamidación en las posiciones 58 y 59 (usando la numeración de IMGT) para potenciar, de esta manera, la estabilidad con respecto a la secuencia de CDR2 de dominio variable de cadena pesada (VH) anti-hCXCR3 de ratón inicial.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos de profilaxis antes de la aparición de la T1D, así como métodos para tratar o reducir la progresión de la T1D de aparición reciente en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo neutralizante de CXCR3. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un humano.

El sujeto que presenta T1D de aparición reciente puede tratarse mediante los métodos descritos en la presente memoria en los 6 meses posteriores al diagnóstico clínico. En otras realizaciones, el sujeto se trata más de 6 meses después del diagnóstico clínico, en donde el sujeto conserva los niveles séricos integrados de péptido C en ayunas residuales de al menos aproximadamente 0,2 nmol/L.

- Los sujetos se pueden caracterizar por niveles de glucosa en sangre en ayunas elevados en ausencia de insulina exógena mayores que 120 mg/dL o un nivel sérico integrado de péptido C en ayunas anormalmente bajo de aproximadamente 0,033 a 1,0 nmol/L x min durante la estimulación con péptido C. El anticuerpo neutralizante de CXCR3 se administra a una dosis de aproximadamente 0,03-3,7 mg/kg/dosis. Se puede administrar al sujeto al menos una dosis de anticuerpo. Se pueden administrar al sujeto dosis repetidas de anticuerpo (p. ej., al menos anualmente, trimestralmente, bimensualmente, mensualmente, bisemanalmente, semanalmente o diariamente). Los métodos descritos anteriormente pueden comprender, además, la etapa de administrar un inmunosupresor y/o agente estimulante de células β de manera simultánea o secuencial (antes o después) de administrar el anticuerpo neutralizante de CXCR3.
- Los anticuerpos anti-CXCR3 descritos en la presente memoria se administran para tratar una afección caracterizada por la expresión anormal de CXCR3. Se pueden administrar para tratar cualquier afección que se pueda beneficiar de la disminución y/o neutralización de la actividad de CXCR3. Los anticuerpos anti-CXCR3 descritos en la presente memoria se administran para tratar la T1D.
- Las realizaciones y ventajas de la invención, así como ejemplos comparativos adicionales se expondrán en parte en la descripción a continuación.
- Se entenderá que tanto la descripción general precedente como la siguiente descripción detallada son solamente ilustrativas y explicativas y no limitan la invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas.
- Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen parte de la presente memoria descriptiva, ilustran una (diversas) realización(es) de la invención y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.
- Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 muestra la expresión de insulina (panel izquierdo), CXCL10 (panel central) y CD3 (panel derecho) en secciones del páncreas de ratones NOD hembra de 6 semanas (primera hilera), ratones NOD hembra de 10 semanas (segunda hilera) y ratones NOD hembra con diabetes de aparición reciente (tercera hilera).
- La Figura 2 es un análisis de citometría de flujo de la expresión de CXCR3 en linfocitos T del páncreas de ratones NOD hembra con diabetes de aparición reciente. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ se identificaron y tiñeron para determinar la expresión de CXCR3, como se muestra mediante la línea continua en los dos gráficos inferiores. La tinción con el testigo de isotipo se muestra mediante la curva sombreada en los mismos dos gráficos.
- La Figura 3 muestra el porcentaje de ratones NOD hembra no diabéticos a lo largo del tiempo para animales tratados con PBS, anti-CXCR3 e IgG testigo comenzando a las 10 semanas de edad, antes de la aparición de la diabetes. Los resultados de dos estudios independientes se muestran en las Figuras 3A y 3B.
- La Figura 4 muestra secciones de páncreas de ratones NOD hembra no diabéticos de 26 semanas tratados profilácticamente con el anticuerpo anti-CXCR3 comenzando a las 10 semanas de edad y la tinción para determinar la insulina (panel izquierdo) o CD3/Foxp3 (paneles central y derecho). El panel derecho es una imagen ampliada de la sección que se muestra en el panel central.
- La Figura 5 muestra los niveles de glucosa en sangre diarios en la mañana para ratones NOD hembra tratados con PBS, anticuerpo anti-CXCR3, IgG testigo y anticuerpo globulina anti-timocito murino (timoglobulina murina, mATG) comenzando 3-4 días después de que se consideró al ratón diabético. Cada línea representa un ratón individual. Las flechas indican los días en que se proporcionó tratamiento.
- La Figura 6A es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de linfocitos T de ratones NOD hembra tratados con PBS, anticuerpo anti-CXCR3, IgG testigo y anticuerpo mATG que eran CD4+ (gráfico izquierdo) y CD8+ (gráfico derecho). Se extrajo el páncreas de ratones durante el ciclo de tratamiento después de la quinta inyección del artículo de prueba y de ratones de la misma edad tratados con mATG. La Figura 6B es un gráfico de la expresión de CD44 (eje vertical) con respecto a la expresión de CD62L (eje horizontal) en linfocitos T CD4+ del páncreas de ratones tratados con PBS, anticuerpo testigo o anticuerpo anti-CXCR3. G1 y G2 hace referencia a los linfocitos T adquiridos por CD44 elevado / CD62L bajo y CD44 bajo / CD62L bajo, respectivamente. La Figura 6C muestra la expresión de CXCR3 en linfocitos T CD4+ en G1 y G2, en comparación con la expresión de CXCR3 en células teñidas con el anticuerpo testigo de isotipo y adquiridos en linfocitos.
- La Figura 7 muestra secciones de páncreas de ratones NOD hembra tratados con IgG testigo (paneles izquierdos), anticuerpo anti-CXCR3 (paneles centrales) y mATG (paneles derechos) y teñidas para determinar la insulina (hilera superior) o CD3 / Foxp3 (hilera inferior).
- La Figura 8A-D es un gráfico de los niveles de glucosa en sangre tras la exposición a glucosa en ratones NOD hembra no diabéticos (Figura 8A), ratones NOD diabéticos tratados con PBS (Figura 8B), ratones NOD en remisión de la enfermedad tras tratamiento con el anticuerpo anti-CXCR3 (Figura 8C) y ratones NOD diabéticos tratados con el anticuerpo IgG testigo (Figura 8D) de la misma edad. La exposición a glucosa se llevó a cabo en ratones 100 días

después del diagnóstico inicial de diabetes y su inclusión en el estudio. Cada línea representa datos de un animal individual.

La Figura 9A-B muestra el porcentaje de ratones no diabéticos a lo largo del tiempo para receptores de NOD.Scid que recibieron linfocitos T CD4+ y CD8+ de donantes reunidos aislados a partir de ratones NOD hembra tratados con PBS, anti-CXCR3, IgG testigo o anticuerpos mATG. Los linfocitos T se aislaron a partir de ratones NOD hembra diabéticos aproximadamente 80-90 días después del tratamiento con PBS o IgG testigo, o a partir de ratones NOD hembra en remisión de la enfermedad aproximadamente 80-90 días después del tratamiento con anticuerpos anti-CXCR3 o mATG. Los resultados de dos estudios independientes se muestran en las Figuras 9A y 9B.

La Figura 10A muestra el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ de donantes aislados a partir de ratones NOD hembra tratados con PBS, anti-CXCR3, IgG testigo o anticuerpos mATG (panel izquierdo) según se describe en la Figura 9. El porcentaje de células efectoras y de memoria central en las concentraciones de donantes de linfocitos T CD4+ y CD8+ para cada grupo de tratamiento se muestran en los paneles derechos de la Figura 10A. La Figura 10B muestra el porcentaje de linfocitos T reguladores en las concentraciones de linfocitos T de donantes identificados por la expresión de CD4 y CD25 o por la expresión de CD4, CD25 y Foxp3. La Figura 10C muestra el porcentaje de CD8+ (panel izquierdo) y CD4+ (panel derecho) en las concentraciones de linfocitos T de donantes que también expresan CXCR3.

La Figura 11A-B muestra el porcentaje de ratones no diabéticos a lo largo del tiempo tras la transferencia adoptiva de linfocitos T desde ratones transgénicos TCR específicos de OVA donantes a ratones receptores RIP-OVA que se dejaron sin tratamiento o se trataron con anticuerpo anti-CXCR3 o IgG testigo. Los resultados de dos estudios se muestran en las Figuras 11A y 11B.

La Figura 12A muestra la expresión de CXCR3 en linfocitos T donantes analizada mediante citometría de flujo antes de la transferencia adoptiva a los ratones receptores RIP-OVA (curva continua). La tinción con el anticuerpo testigo de isotipo se muestra en la curva sombreada. La Figura 12B muestra el porcentaje de células donantes en la sangre, bazo y ganglios linfáticos pancreáticos de ratones receptores tratados con anticuerpo anti-CXCR3 o IgG testigo a los 2, 4, 7, 9 y 15 días después de la transferencia adoptiva. La Figura 12C muestra el porcentaje de células donantes proliferantes en la sangre, bazo y ganglios linfáticos pancreáticos de ratones receptores tratados con anticuerpo anti-CXCR3 o IgG testigo tras la transferencia adoptiva. La Figura 12D muestra el porcentaje de células donantes CXCR3+ en la sangre, bazo y ganglios linfáticos pancreáticos de ratones receptores tratados con anticuerpo anti-CXCR3 o IgG testigo tras la transferencia adoptiva.

La Figura 13 muestra secciones de páncreas de ratones receptores RIP-OVA que se dejaron sin tratamiento y teñidas para determinar la insulina (izquierdo superior) o CD3 (derecho superior), o tratados con anticuerpo anti-CXCR3 y teñidas para determinar la insulina (izquierdo inferior) o CD3 (derecho inferior). El páncreas se extrajo 60 días después de la transferencia adoptiva de los linfocitos T de donantes.

Las Figuras 14A-C muestran el nivel de inhibición de la quimiotaxia mediada por CXCR3 a CXCL11 mediada por los clones CI 4, 12, 53, 82 y 135. Los datos se muestran como unidades de fluorescencia relativa media (UFR) de las células que migran en el ensayo de quimiotaxia. La Figura 14D muestra la concentración del anticuerpo necesaria para inhibir la movilización de calcio un 50 % para los clones de anticuerpo CI 4, 12, 53 y 135.

La Figura 15A-C muestra el nivel de inhibición de la quimiotaxia mediada por CXCR3 a CXCL9 (Figura 15A), CXCL10 (Figura 15B) y CXCL11 (Figura 15C) mediada por los clones CI 4, 12, 53, 82 y 135. Los datos se muestran como unidades de fluorescencia relativa media (UFR) de las células que migran en el ensayo de quimiotaxia.

La Figura 16 muestra histogramas de anticuerpo que se une a células que expresan diversos receptores de quimiocina diferentes. La concentración de anticuerpo unido aumenta a lo largo del eje horizontal de cada histograma.

La Figura 17A muestra una alineación de los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VK) para el clon 4.0 (etiquetado como «genitor») y ciertas variantes humanizadas (etiquetadas como VH1-3 y 7-11 y VK 1-3). La Figura 17B muestra una alineación de los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VK) para el clon 12.0 (etiquetado como «genitor») y ciertas variantes humanizadas (etiquetadas como VH1-3 y VK 1-3). La Figura 17C muestra una alineación de los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VK) para el clon 53.0 (etiquetado como «genitor») y ciertas variantes humanizadas (etiquetadas como VH1-6 y VK 1-9). La Figura 17D muestra una alineación de los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VK) para el clon 82.0 (etiquetado como «genitor») y ciertas variantes humanizadas (etiquetadas como VH1-3 y VK 1-3). La Figura 17E muestra una alineación de los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VK) para el clon 135.0 (etiquetado como «genitor») y ciertas variantes humanizadas (etiquetadas como VH1-3 y VK 1-3). La Figura 17F muestra una alineación de los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VK) para el clon 4.0 (etiquetado como «genitor») y ciertas variantes humanizadas 4D (etiquetadas como VH4-6 y VK4-7). La Figura 17G muestra una alineación de los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VK) para el clon 53.0 (etiquetado como «genitor») y ciertas variantes humanizadas 4D (etiquetadas como VH7-10 y VK10-13). La secuencia inferior en cada alineación en las Figuras 17A-G representa las secuencias de línea germinal humana más cercanas. Los recuadros

negros indican los dominios CDR, los residuos sombreados varían en secuencia con respecto al residuo de la línea germinal correspondiente (Figuras 17A-E) o al residuo genitor correspondiente (Figuras 17F-G), se usa la numeración IMGT y la delimitación de CDR. La Figura 17H muestra una alineación de los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VK) para los clones 4.0, 12.0, 82.0 y 135, así como para los clones de anticuerpo 5H7 y 7H5. Los recuadros negros indican los dominios CDR, los residuos sombreados varían en secuencia con respecto a la secuencia anterior en la alineación, se usa la numeración IMGT.

La Figura 18 muestra los límites de los residuos de epítipo mínimo para los clones de anticuerpo 4, 12, 53, 82 y 135. Los residuos importantes para la actividad de unión se indican mediante una X.

La Figura 19 es un histograma que muestra la unión del anticuerpo en células humanas 300.19 transfectadas con CXCR3 para los clones quiméricos 4, 12, 53, 82 y 135, así como las variantes humanizadas Hu1, Hu2, Hu3. El anticuerpo se administró a 5 µg/ml (línea negra), 0,5 µg/ml (línea gris oscura) o 0,1 µg/ml (línea punteada negra) o 5 µg/ml de anticuerpo secundario solo (histograma relleno gris) y los datos se grafican como la cantidad de células (eje horizontal) con respecto al porcentaje de fluorescencia máxima.

La Figura 20A-C muestra el porcentaje de inhibición de la migración (eje vertical) de células humanas transfectadas con CXCR3 a CXCL9 (Figura 20A), CXCL10 (Figura 20B) y CXCL11 (Figura 20C) en presencia o ausencia de 10 µg/ml de variantes de anticuerpo quiméricas (Quim) o humanizadas (Hu1, Hu2 o Hu3) de los clones 4, 12, 53, 82 y 135, o el clon comercial 1C6.

La Figura 21 es un gráfico que muestra la capacidad de las variantes de anticuerpo quiméricas (Quim) y humanizadas (Hu1, Hu2 o Hu3) de los clones 4, 12, 53, 82 y 135 y el clon comercial 1C6 para inhibir la movilización de calcio en células CHO humanas transfectadas con CXCR3-Gq4q4. La concentración del anticuerpo (eje horizontal) se grafica con respecto al porcentaje de inhibición máxima (eje vertical).

La Figura 22A-D muestra los efectos del tratamiento con el anticuerpo anti-CXCR3 sobre el porcentaje de linfocitos T CD3+/CD4+ (Figura 22A), linfocitos T CD3+/CD8+ (Figura 22B), linfocitos T CXCR3+/CD3+/CD4+ (Figura 22C) y linfocitos T CXCR3+/CD3+/CD8+ (Figura 22D) en ratones *NOD-scid IL2γ^{null}* (NSG). Hulg1 indica IgG1 humana (Herceptin), los clones 4, 12, 53, 82 y 135 hacen referencia a los clones de anticuerpo quiméricos.

La Figura 23A representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 12.0. La Figura 23B representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 12.1. La Figura 23C representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 12.2. La Figura 23D representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 12.3.

La Figura 24A representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 135.0. La Figura 24B representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 135.1. La Figura 24C representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 135.2. La Figura 24D representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 135.3.

La Figura 25A representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.0. La Figura 25B representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.1. La Figura 25C representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.2. La Figura 25D representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.3. La Figura 25E representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.4. La Figura 25F representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.5. La Figura 25G representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.6. La Figura 25H representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.7. La Figura 25I representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.8. La Figura 25J representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.9. La Figura 25K representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.10. La Figura 25L representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 4.11. La Figura 25M representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 4.4. La Figura 25N representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 4.5. La Figura 25O representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 4.6. La Figura 25P representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 4.7.

La Figura 26A representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.0. La Figura 26B representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.1. La Figura 26C representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.2. La Figura 26D representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.3. La Figura 26E representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.4. La Figura 26F representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.5. La Figura 26G representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.6. La Figura 26H representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.4. La Figura 26I representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.5. La Figura 26J representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.6. La Figura 26K representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.7. La

Figura 26L representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.8. La Figura 26M representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.9. La Figura 26N representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.7. La Figura 26O representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.8. La Figura 26P representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.9. La Figura 26Q representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 53.10. La Figura 26R representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.10. La Figura 26S representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.11. La Figura 26T representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.12. La Figura 26U representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena ligera y ligera 53.13.

La Figura 27A representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 82.0. La Figura 27B representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 82.1. La Figura 27C representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 82.2. La Figura 27D representa las secuencias de aminoácidos para clones de cadena pesada y ligera 82.3.

La Figura 28A-P muestra las secuencias de ácido nucleico para los clones de cadena pesada 12.0-12.3 y los clones de cadena ligera 12.0-12.3, los clones de cadena pesada 135.0-135.3 y los clones de cadena ligera 135.0-135.3, los clones de cadena pesada 4.0-4.11 y los clones de cadena ligera 4.0-4.7, los clones de cadena pesada 53.0-53.6 y los clones de cadena ligera 53.0-53.9 y los clones de cadena pesada 82.0-82.3 y los clones de cadena ligera 82.0-82.3.

Realizaciones ilustrativas

A continuación, se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones ilustrativas según la presente descripción, de las cuales se ilustran ciertos ejemplos en los dibujos adjuntos.

CXCR3

El CXCR3 (MIM: 300574, ID de gen humano: 2833, receptor de quimiocina (motivo C-X-C) 3; también conocido como CD182, CD183, CKR-L2, CMKAR3, GPR9, IP10-R, Mig-R, MigR, receptor acoplado a la proteína G 9, receptor de IP-10, receptor de IP10, receptor de Mig, receptor de quimiocina (C-X-C) 3, receptor de proteína 10 inducible por interferón) es un receptor de quimiocina que está en gran medida ausente en linfocitos T indiferenciados, pero aumenta tras la activación con el antígeno y reúne a estas células en sitios de inflamación tisular en respuesta a sus ligandos primarios: CXCL9 (ID de gen humano: 4283), CXCL10 (ID de gen humano: 3627) y CXCL11 (ID de gen humano: 6373). Las células β en el islote de Langerhans expresan CXCL9 y CXCL10 (Frigerio et al., Nature Medicine 8:1414-1420 (2002) y los linfocitos T que han infiltrado el páncreas expresan CXCR3 (Christen et al., The Journal of Immunology, 2003, 171: 6838-6845; Van Halteren et al., Diabetologia 48:75-82 (2005); Uno et al 2010; Roep et al., Clinical and Experimental Immunology, 2003, 159: 338-343; Tanaka et al., Diabetes 58: 2285-2291 (2009); Sarkar et al., Diabetes. 2012 Feb;61(2):436-46).

El CXCR3 se expresa en una variedad de organismos, incluidos, por ejemplo, humano, ratón, rata, vaca, chimpancé, macaco, perro, rana, ornitorrinco, cerdo y pez cebra. La Tabla 1 incluye la ID de gen del Centro nacional de información biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI, por sus siglas en inglés) y la secuencia de referencia proteica para CXCR3 de una variedad de organismos. La SEQ ID NO:1 es la secuencia de CXCR3 humano de longitud completa (variante de empalme A). La secuencia peptídica de la variante de empalme B se proporciona mediante la secuencia de referencia NP_001136269.1. Los dominios extracelulares previstos de la variante de empalme A de CXCR3 humano se describen en Colvin et al., Mol. Cell. Bio., 26: 5838-49 (2006) e incluyen los residuos 1-58, 1-16, 111-126, 190-223, 278-301 de la SEQ ID NO:1, según se muestran a continuación.

SEQ ID NO:1 NP_001495 CXCR3 humano, isoforma A

1 mvlevsdhqv lndaevaall enfsssydyg enesdscts ppcpqdfln fdraflpaly

61 slifllgllg ngavaavlls rrtalsstdt flhlavadt llvltplwa vdaavqwvf

121 sglckvagat fninfyagal llacisfdry lnivhatqly rrgpparvlt tclavwglcl

181 lfalpdfilf sahhderlna thcqynfpqv gtralrvlql vagfllpllv maycyahila

241 vllvsrgqrr lramrlvvvv vvafalcwtp yhlvvlvdiil mdlgalarnc gresrvdvak

301 svtslglymh cclnplyaf vgvkfrermw mllrlgcpn qrglqrqps srrdsswset

361 seasysgl

Tabla 1

Especie	ID de gen	Secuencia proteica
<i>Homo sapiens</i>	2833	NP_001495.1 (A) NP_001136269.1 (B)
<i>Mus musculus</i>	12766	NP_034040.1
<i>Rattus norvegicus</i>	84475	NP_445867.1
<i>Bos taurus</i>	497018	NP_001011673.1
<i>Macaca mulatta</i>	699438	NP_001138512.1
<i>Xenopus tropicalis</i>	496477	NP_001011067.1
<i>Xenopus laevis</i>	443669	AAH73571.1
<i>Canis lupus familiaris</i>	491952	NP_001011887.1
<i>Pan troglodytes</i>	465704	XP_521125.2 XP_001137964.1 XP_001137867.1
<i>Sus scrofa</i>	492278	CAH64842.1
<i>Danio rerio</i>	791973 654692	NP_001007315.1, XP_001330996.1 NP_001082899.2, XP_001923160.1
<i>Salmo salar</i>	100195464	NP_001133965.1
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	100085584	XP_001515888.1

CXCR3 y CXCL10 se expresan en pacientes humanos con T1D. Uno et al., Endocrine J. 57: 991-996 (2010); Roep et al., Clin. and Exp. Immun. 159: 338-343 (2009); Tanaka et al., Diabetes 58: 2285-2291 (2009). En estos pacientes, CXCL10 se expresa en las células beta productoras de insulina restantes en los islotes. CXCR3 se expresa en los linfocitos T invasores que rodean a los islotes. Se han reproducido patrones de expresión similares en ratones diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés), un modelo de diabetes en ratón. Morimoto et al., J. Immun. 173: 7017-7024 (2004); Li et al., World J Gastroenterol. 11(30): 4750-4752 (2005); Sarkar et al. Diabetes. 2012 Feb;61(2):436-46).

- 10 CXCR3 también se expresa en linfocitos T presentes en ciertos tipos de tejidos inflamados, mientras que CXCL9, CXCL10 y CXCL11 se producen a menudo por células locales en lesiones inflamatorias. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se describen tratamientos para interrumpir el CXCR3 para tratar la T1D.

Anticuerpos

- 15 El término «anticuerpo», según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno independientemente de la fuente, especie de origen, método de producción y/o características, y abarca inmunoglobulinas o partes o fragmentos de unión a antígeno de estas. Como ejemplo no limitante, el término «anticuerpo» incluye anticuerpos humanos, de orangután, ratón, rata, cabra, oveja y pollo. El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, completamente humanos, camelizados, de cadena simple, quiméricos, sintéticos,
- 20 recombinantes, híbridos, mutados, retromutados e injertados con CDR. A los efectos de la presente invención, también incluye, a menos que se indique lo contrario, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, VHH (también denominados nanocuerpos), y otros fragmentos de anticuerpo que conservan la función de unión a antígeno, incluidos anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos. El término «anticuerpo» también se refiere a moléculas de unión a antígeno que no se basan en inmunoglobulinas. Por ejemplo, las estructuras distintas de
- 25 inmunoglobulina conocidas en la técnica incluyen productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (véanse, p.

ej., las publicaciones de solicitud de patente estadounidense núms. 20080181892 y 20080227958 publicadas el 31 de julio de 2008 y el 18 de septiembre de 2008, respectivamente), tetranectinas, dominios de fibronectina (*p. ej.*, AdNectins, véase la publicación de solicitud de patente estadounidense núm. 2007/0082365, publicada el 12 de abril de 2007), proteína A, lipocalinas (véase, *p. ej.*, la patente estadounidense núm. 7.118.915), repeticiones de anquirina y tiorredoxina.

El término «dominio de unión a antígeno» se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente o que es complementaria a una parte o un antígeno completo. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse solo a una parte específica del antígeno. En ciertas realizaciones, un anticuerpo para CXCR3 o fragmento de unión a antígeno comprende al menos un dominio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento es multiespecífico y comprende dos o más (*p. ej.*, 2, 3, 4, 5 o más) dominios de unión a antígeno, de manera que el anticuerpo o fragmento es capaz de unirse a dos o más moléculas de CXCR3 en el mismo epítipo o en diferentes, o es capaz de unirse a CXCR3 y a al menos un otro antígeno con afinidad elevada. La porción de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Estos fragmentos pueden comprender la región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo genitor o de una variante de un anticuerpo genitor.

El «epítipo» o «determinante antigénico» es una porción de una molécula de antígeno que es responsable de interacciones específicas con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un dominio de unión a antígeno puede proporcionarse mediante uno o más dominios variables de anticuerpo. El dominio de unión a antígeno puede comprender al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y al menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH). Un dominio de unión a antígeno puede comprender también regiones solo VH o solo VL. Por ejemplo, los anticuerpos de camellos y llamas (Camelidae, camélidos) incluyen un tipo de anticuerpo único, que está formado por cadenas pesadas solo y está desprovisto de cadenas ligeras. El sitio de unión a antígeno de dichos anticuerpos es de un dominio simple, denominado VHH. Han recibido el nombre de «anticuerpos camelizados» o «nanocuerpos». Véanse, *p. ej.*, las patentes estadounidenses núms. 5.800.988 y 6.005.079 y las publicaciones de solicitud internacionales núms. WO 94/04678 y WO 94/25591.

Los anticuerpos anti-CXCR3 descritos en la presente memoria se pueden generar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la técnica (Harlow et al., *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed. (1988)). Los inmunógenos que comprenden polipéptidos de CXCR3, fragmentos de estos (*p. ej.*, uno o más dominios extracelulares, o los 58 aminoácidos del extremo N, o los 37 aminoácidos del extremo N, o los 20 aminoácidos del extremo N, o los 16 aminoácidos del extremo N, etc.), proteínas de fusión o variantes de estos se pueden usar para generar los anticuerpos anti-CXCR3.

El inmunógeno se puede producir mediante una célula que produce o sobreproduce CXCR3, que puede ser una célula de origen natural, una célula mutante de origen natural o una célula genéticamente manipulada. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (*p. ej.*, porcentaje de hidrofobicidad, porcentaje de hidrofiliicidad, estabilidad, carga neta, punto isoelectrico, etc.), el inmunógeno puede modificarse o conjugarse para alterar su inmunogenicidad. Por ejemplo, el CXCR3 o una porción de este puede conjugarse con un vehículo. La conjugación puede incluir una conjugación química como derivación con grupos funcionales químicos activos, o a través de una metodología basada en proteínas de fusión u otros métodos conocidos para el experto en la técnica. Los ejemplos de vehículos y/u otras proteínas para alterar la inmunogenicidad incluyen, pero no se limitan a, KLH, ovoalbúmina, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de semilla de soja y péptidos T cooperadores promiscuos.

También se pueden usar diversos adyuvantes con el inmunógeno de CXCR3 para aumentar la respuesta inmunológica. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), aceites minerales, geles, alumbre (hidróxido de aluminio), sustancias surfactantes tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianinas de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), dinitrofenol y adyuvantes humanos, tales como BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Los ejemplos adicionales de adyuvantes que se pueden emplear incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Los protocolos de inmunización se conocen en la técnica y se pueden llevar a cabo mediante cualquier método que desencadene una respuesta inmunitaria en el hospedante animal elegido. Por lo tanto, se pueden usar diversas vías de administración en diversos períodos de tiempo como diseño de elección.

Por ejemplo, un inmunógeno, como se ejemplifica en la presente memoria, se puede administrar a diversos animales hospedantes que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, camélidos, ratas, etc., para inducir la producción de suero que contiene anticuerpos policlonales específicos para CXCR3. La administración del inmunógeno puede implicar una o más inyecciones de un agente inmunizante y, opcionalmente, un adyuvante. En algunas realizaciones, el inmunógeno (con o sin adyuvante) se inyecta en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, o intramuscularmente o intravenosamente. En algunas realizaciones, después de que se obtiene una preparación policlonal adecuada, se pueden aislar anticuerpos específicos mediante técnicas de separación conocidas, tales como cromatografía de afinidad, inmunoabsorción, absorción, etc., de manera que se

pueda obtener una especie de anticuerpo individual. En algunas realizaciones, la especie de anticuerpo individual se somete a estudio adicional, por ejemplo, secuenciación para obtener las secuencias de aminoácidos de una o más CDR.

En algunas realizaciones, los anticuerpos para CXCR3 son monoclonales. Un anticuerpo monoclonal incluye cualquier anticuerpo derivado de un clon simple eucariótico, fágico o procariótico que expresa el anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse, por ejemplo, a través de técnicas de hibridoma tradicionales (Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-499 (1975) y la patente estadounidense N.º 4.376.110), métodos de ADN recombinante (la patente estadounidense n.º 4.816.567), o técnicas de visualización en fagos usando bibliotecas de anticuerpos (Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991)). Para diversas otras técnicas de producción de anticuerpo, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Otros ejemplos de métodos que se pueden emplear para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kosbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); y Cole et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026 (1983)), y la técnica de EBV-hibridoma (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgG, IgM, IgE, IgA e IgD, y cualquier subclase o variante de estas. El hibridoma que produce el mAb de la invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

En algunas realizaciones, un inmunógeno que comprende polipéptidos de CXCR3, fragmentos de estos (p. ej., uno o más dominios extracelulares, o los 58 aminoácidos del extremo N, o los 37 aminoácidos del extremo N, o los 20 aminoácidos del extremo N, o los 16 aminoácidos del extremo N, etc.), proteínas de fusión o variantes de estos se pueden usar para inmunizar un animal hospedante (p. ej., conejos, ratones, camélidos, ratas, etc.) para generar los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales. Los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente a CXCR3 se pueden recoger del hospedante inmunizado y fusionarse con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como, polietilenglicol, para formar células de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986)).

Se pueden generar múltiples hibridomas que producen anticuerpos monoclonales y se pueden seleccionar aquellos que exhiben propiedades beneficiosas o sugieren potencial terapéutico, por ejemplo, al prevenir la unión del ligando de CXCR3 con su receptor. Los anticuerpos seleccionados se pueden modificar adicionalmente para obtener o potenciar propiedades beneficiosas, tal como tener estabilidad *in vivo* mejorada. Por ejemplo, después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse usando procedimientos de dilución y cultivarse mediante métodos de cultivo estándares (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986)). Los medios de cultivo adecuados incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM) o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores en un animal. Los subclones se pueden someter a ensayo para determinar su especificidad, afinidad y/o actividad, y los subclones que exhiben las propiedades más beneficiosas se pueden seleccionar para someterse a caracterización adicional.

Existe una variedad de métodos alternativos en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales, cualquiera de los cuales se puede usar para producir los anticuerpos anti-CXCR3 descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente estadounidense N.º 4.816.567.

El ADN que codifica anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse usando procedimientos convencionales (p. ej., mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos, o las cadenas de anticuerpos humanos, humanizados u otros) (Innis et al. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic (1990) y Sanger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463 (1977)). Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN. Después de que se aísla, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se pueden transfectar en células hospedantes tales como células de *E. coli*, células NSO, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), células de mieloma que de cualquier otra manera no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedantes recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente estadounidense N.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851 (1984)) o al unir covalentemente la secuencia codificante de inmunoglobulina a toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido distinto de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, un polipéptido distinto de inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación con CXCR3 de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden modificar para generar anticuerpos injertados con CDR y/o humanizados de cualquier otra manera. El injerto de CDR es una forma de humanización, pero también se pueden usar otras técnicas de humanización conocidas en la técnica. Los procedimientos de injerto de CDR son conocidos para los expertos en la técnica y se pueden basar en designaciones de numeración de CDR incluidos los esquemas de numeración de IMGT (el *international ImMunoGeneTics information system*®, Montpellier, Francia), Kabat, Chothia y Chothia modificado. Véase, p. ej.,

imgt.org (que resume el uso del sistema de numeración continuo de IMGT, que toma en cuenta y combina la definición de las regiones de marco y de determinación de la complementariedad, datos estructurales de estudios de difracción de rayos X y la caracterización de los bucles hipervariables, para proporcionar la numeración única para todas las regiones V IG y TR de todas las especies); Abhinandan and Martin, *Mol Immunol.*, 45:3832-9 (2008); véase también Abhinandan and Martin, *J. Mol. Biol.*, 369(3):852-62 (2007) (que describe métodos para evaluar la «humanidad» de un anticuerpo quimérico); Retter et al., *Nucleic Acids Res.* 33(Database issue):D671-4 (2005) (que describe la base de datos VBASE2 de genes de dominio variable); y Johnson and Wu, *Int. Immunol.* 10(12):1801-5 (1998) (que describe la distribución de longitudes de CDRH3).

Por ejemplo, mediante el uso del sistema de numeración de IMGT, los aminoácidos conservados siempre tienen la misma posición. Los aminoácidos hidrófobos de las regiones de marco también se numeran en posiciones conservadas, lo que permite que los aminoácidos de marco (y codones) ubicados en las mismas posiciones en diferentes secuencias se comparen sin requerir alineaciones de secuencias. En otro ejemplo, el sistema de numeración de Kabat es el siguiente, la CDR-H1 comienza aproximadamente en el aminoácido 31 (*es decir*, aproximadamente 9 residuos después del primer residuo cisteína), incluye aproximadamente 5-7 aminoácidos y termina en el siguiente residuo tirosina. La CDR-H2 comienza en el decimoquinto residuo después del fin de CDR-H1, incluye aproximadamente 16-19 aminoácidos y termina en el siguiente residuo arginina o lisina. La CDR-H3 comienza aproximadamente en el trigésimo tercer residuo de aminoácido después del fin de CDR-H2; incluye 3-25 aminoácidos; y termina en la secuencia W-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido. La CDR-L1 comienza aproximadamente en el residuo 24 (*es decir*, tras un residuo cisteína), incluye aproximadamente 10-17 residuos; y termina en el siguiente residuo tirosina. La CDR-L2 comienza aproximadamente en el decimosexto residuo después del fin de CDR-L1 e incluye aproximadamente 7 residuos. La CDR-L3 comienza aproximadamente en el trigésimo tercer residuo después del fin de CDR-L2; incluye aproximadamente 7-11 residuos y termina en la secuencia F-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido. Los anticuerpos que contienen al menos una de estas CDR pueden usarse en los métodos de la presente descripción.

Los anticuerpos con injerto de CDR pueden comprender secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano, en donde una o más de las regiones CDR de VH y/o VL se reemplazan con secuencias de CDR de los anticuerpos donantes, p. ej., de los anticuerpos murinos descritos más adelante que se unen a CXCR3. Una secuencia de marco de cualquier anticuerpo humano puede servir como plantilla para injertar la CDR. Sin embargo, el reemplazo directo de la cadena de CDR en dicho marco puede conducir a alguna pérdida de afinidad de unión al antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano con respecto al original, p. ej., un anticuerpo murino, menor es la probabilidad de que combinar las CDR del donante con el marco humano introduzca alteraciones en las CDR que podrían reducir la afinidad. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos para CXCR3 con injerto de CDR de la presente descripción comprenden un marco variable humano que tiene al menos un 65 % de identidad de secuencia con el marco de región variable del anticuerpo neutralizante de CXCR3 murino donante. Los métodos para producir dichos anticuerpos se conocen en la técnica (véanse EP 239.400; la publicación PCT n.º WO 91/09967; y las patentes estadounidenses núms. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), e incluyen el rebarnizado o rechapado (EP 592.106; EP 519.596; Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28(4/5): 489-498; Studnicka et al. (1994) *Prot. Engineer.* 7(6): 805-814; y Roguska et al. (1994) *Proc. Acad. Sci. USA* 91: 969-973), transposición de cadena (patente estadounidense n.º 5.565.352) y anticuerpos antiidiotípicos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden humanizar. Los «anticuerpos humanizados» son moléculas de anticuerpo que se unen al antígeno deseado, tienen una o más CDR de una especie no humana y tiene regiones de marco y/o dominios constantes de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humanas conocidas se describen en, p. ej., [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi); www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; y Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Dept. Health (1983). Las secuencias humanas importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, asociación, disociación, avidez, especificidad, semivida o cualquier otra característica adecuada, según se conoce en la técnica. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, las descritas en Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239: 1534; Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901; Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.* 151: 2623; las patentes estadounidenses núms. 5.589.205; 5.653.332; 6.180.370; 6.632.927; 7.241.877; 7.244.615; 7.244.832; 7,262,0505; y la publicación de patente estadounidense n.º 2004/0236078 (presentada el 30 de abril de 2004).

En ciertas realizaciones, los residuos de marco en anticuerpos humanizados o con injerto de CDR se pueden sustituir con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR, p. ej., sustituir con los residuos de marco de un anticuerpo neutralizante anti-CXCR3 de ratón, para alterar, p. ej., mejorar, la unión al antígeno. Véase Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-33 (diciembre de 1989). Estas sustituciones de marco se identifican mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej., mediante modelado de las interacciones de los residuos de CDR y marco para identificar residuos de marco importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencia para identificar residuos de marco inusuales en posiciones específicas. Véanse, p. ej., la patente estadounidense n.º 5.585.089; y Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales se encuentran disponibles comúnmente y son conocidos para los expertos en la técnica. Existen programas informáticos disponibles que ilustran y exhiben las probables estructuras de conformación tridimensionales de

secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De este modo, los residuos de marco se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias de consenso e importación, para obtener las características de anticuerpo deseadas, tal como la afinidad aumentada por CXCR3.

Los anticuerpos se pueden humanizar o injertar con CDR y los residuos de marco de los donantes de CDR que son útiles para mejorar la unión a antígeno se pueden identificar mediante el uso de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, las descritas en Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239: 1534; Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901; Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.* 151: 2623; y las patentes estadounidenses núms. 5.565.332; 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; y 4.816.567. En algunas realizaciones, se usa humanización 4D para preparar variantes de anticuerpo de la presente descripción (p. ej., para preparar las variantes humanizadas 4D del clon 4, que comprenden una cualquiera de las cadenas pesadas 4.4-4.6 y una cualquiera de las cadenas ligeras 4.4-4.7). Véase WO 2009/032661, p. ej., en los párrafos [0037]-[0044] para métodos usados en la humanización 4D. De manera resumida, la humanización 4D puede comprender: a) construir un modelo 3-D del dominio variable que se va a humanizar; b) identificar los residuos flexibles en el dominio variable mediante el uso de una simulación de dinámica molecular del modelo 3-D del dominio; c) identificar la línea germinal humana más próxima al comparar la trayectoria de la dinámica molecular del modelo 3-D con las trayectorias de la dinámica molecular de 49 líneas germinales humanas; y d) mutar los residuos flexibles, que no son parte de la CDR, en su contraparte de la línea germinal humana (según se identificó en la etapa c).

En algunos ejemplos descritos en la presente memoria, los anticuerpos injertados con CDR y/o humanizados de cualquier otra manera pueden comprender variante injertadas con CDR y/o humanizadas de los clones 4, 12, 53, 82 y 135. Por ejemplo, las regiones de cadena pesada y ligera correspondientes de uno cualquiera de los clones 4, 12, 53, 82 y 135 (p. ej., la cadena pesada del clon 4 y la cadena ligera del clon 4) se pueden unir a los dominios constantes humanos para formar anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos quiméricos se pueden humanizar adicionalmente al cambiar uno o más aminoácidos de marco o CDR por el residuo humano correspondiente. Asimismo, en algunos ejemplos, las seis regiones de CDR de cadena pesada y ligera de uno cualquiera de los clones 4, 12, 53, 82 y 135 (p. ej., las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada del clon 4 y las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del clon 4) o de cualquiera de las variantes de los clones 4, 12, 53, 82 y 135 se pueden subclonar en los dominios de marco y/o constantes humanos para formar anticuerpos humanizados. La humanización puede incluir usar dominios variables humanos, excluidos los aminoácidos de las CDR y/o cualesquiera residuos en la posición de Vernier. Los anticuerpos humanizados también pueden incluir cambios retromutados adicionales en los residuos posicionados a cuatro aminoácidos de las CDR y/o en posiciones identificadas como «muy distintas» entre la secuencia del anticuerpo original y las secuencias humanas, p. ej., mediante el uso del modelado basado en IMGT. Se pueden introducir mutaciones adicionales en las regiones de marco o CDR para potenciar la estabilidad o eficacia terapéutica del anticuerpo, por ejemplo, al introducir mutaciones para retirar un sitio de desamidación en las posiciones 58 y 59 (numeración de IMGT) de la CDR2 de VH del clon 4.

Por ejemplo, los anticuerpos, anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria pueden comprender las seis CDR y/o los dominios variables de cadena pesada y ligera de cualquiera de los clones 4, 12, 53, 82 y 135 y sus variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento capaz de unirse a CXCR3 puede comprender las tres CDR de una cualquiera de las cadenas pesadas 4.0-4.11, las cadenas pesadas 12.0-12.3, las cadenas pesadas 53.0-53.10, las cadenas pesadas 82.0-82.3 y las cadenas pesadas 135.0-135.3. De manera similar, el anticuerpo o fragmento puede comprender las tres CDR de una cualquiera de las cadenas ligeras 4.0-4.7, las cadenas ligeras 12.0-12.3, las cadenas ligeras 53.0-53.13, las cadenas ligeras 82.0-82.3 y las cadenas ligeras 135.0-135.3. En algunos casos, las CDR de cadena pesada y ligera son del mismo clon, pero pueden ser de diferentes variantes de dicho clon (p. ej., las tres CDR de la cadena pesada 4.1 apareadas con las tres CDR de la cadena ligera 4.2). Las cadenas pesada y ligera 4.0, 12.0, 82.0 y 135.0 se refieren al dominio variable en los clones del anticuerpo de ratón y los anticuerpos quiméricos (donde los anticuerpos comprenden dominios variables de ratón y regiones de marco humanas). El resto de las cadenas pesada y ligera se refieren a las cadenas humanizadas según se muestran en la Tabla 11.

El anticuerpo o fragmento capaz de unirse a CXCR3 puede comprender una cualquiera de las cadenas pesadas 4.0-4.11, las cadenas pesadas 12.0-12.3, las cadenas pesadas 53.0-53.10, las cadenas pesadas 82.0-82.3 y las cadenas pesadas 135.0-135.3. De manera similar, el anticuerpo o fragmento puede comprender una cualquiera de las cadenas ligeras 4.0-4.7, las cadenas ligeras 12.0-12.3, las cadenas ligeras 53.0-53.13, las cadenas ligeras 82.0-82.3 y las cadenas ligeras 135.0-135.3.

Las cadenas pesada y ligera se pueden seleccionar de manera que las tres CDR de una cadena pesada de un clon específico (p. ej., las CDR de una cadena pesada del clon 4) se aparean con las tres CDR de cualquiera de las cadenas ligeras de dicho clon (p. ej., las CDR de una cadena ligera del clon 4). Las cadenas pesada y ligera se pueden seleccionar de manera que una cadena pesada de un clon específico (p. ej., una cadena pesada del clon 4) se aparee con cualquiera de las cadenas ligeras de dicho clon (p. ej., una cadena ligera del clon 4).

Las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 4.0-4.11 se pueden aparear con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 4.0-4.7; las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 12.0-12.3 se pueden aparear con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 12.0-12.3; las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 53.0-53.10 se pueden aparear con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 53.0-53.13; las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 82.0-82.3 se pueden aparear con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 82.0-82.3; o las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 135.0-135.3 se pueden aparear con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 135.0-135.3.

Uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 4.0-4.11 se puede aparear con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 4.0-4.7, uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 12.0-12.3 se puede aparear con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 12.0-12.3, uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 53.0-53.10 se puede aparear con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 53.0-53.13, uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 82.0-82.3 se puede aparear con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 82.0-82.3 o uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 135.0-135.3 se puede aparear con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 135.0-135.3.

Una alineación de ciertos dominios variables de cadena pesada y ligera se muestra en la Figura 17. Un anticuerpo, según se describe en la presente memoria, puede comprender los dominios variables de cadena ligera y pesada apareados según se muestran en la Tabla 2 (Ch = químico, Hu = humanizado, VH = cadena pesada, VK = cadena ligera). Por ejemplo, la primera línea en la Tabla 2 indica una variante del clon 4 que comprende la cadena pesada 4.0 y la cadena ligera 4.0. La segunda línea indica una variante del clon 4 que comprende la cadena pesada 4.1 y la cadena ligera 4.1. A cada anticuerpo, que comprende la secuencia de cadena pesada y cadena ligera indicada, se le asignó también un identificador de anticuerpo en la segunda columna de la Tabla 2. Por ejemplo, a la primera línea en la tabla (que comprende la cadena pesada 4.0 y la cadena ligera 4.0) se le asignó el identificador de anticuerpo 4Ch, mientras que al segundo anticuerpo en la tabla (que comprende la cadena pesada 4.1 y la cadena ligera 4.1) se le asignó el identificador 4Hu1.

Clon	Anticuerpo	Cadena Pesada	SEQ ID NO de VH	Cadena ligera	SEQ ID NO de VK
Clon 4	4Ch	VH	18	VK	19
Clon 4	4Hu1	VH1	20	VK1	21
Clon 4	4Hu2	VH2	22	VK2	23
Clon 4	4Hu3	VH3	24	VK3	25
Clon 4	4Hu4	VH2	22	VK3	25
Clon 4	4Hu5	VH3	24	VK2	23
Clon 4	4Hu6	VH4	26	VK4	34
Clon 4	4Hu7	VH4	26	VK7	37
Clon 4	4Hu8	VH5	27	VK5	35
Clon 4	4Hu9	VH5	27	VK6	36
Clon 4	4Hu10	VH6	28	VK4	34
Clon 4	4Hu11	VH2	22	VK1	21
Clon 4	4Hu12	VH1	20	VK2	23
Clon 4	4Hu13	VH3	24	VK1	21

ES 2 698 606 T3

Clon	Anticuerpo	Cadena Pesada	SEQ ID NO de VH	Cadena ligera	SEQ ID NO de VK
Clon 4	4Hu14	VH1	20	VK3	25
Clon 4	4Hu15	VH7	29	VK2	23
Clon 4	4Hu16	VH8	30	VK2	23
Clon 4	4Hu17	VH9	31	VK2	23
Clon 4	4Hu18	VH10	32	VK2	23
Clon 4	4Hu19	VH11	33	VK2	23
Clon 12	12Ch	VH	2	VK	3
Clon 12	12Hu1	VH1	4	VK1	5
Clon 12	12Hu2	VH2	6	VK2	7
Clon 12	12Hu3	VH3	8	VK3	9
Clon 82	82Ch	VH	55	VK	56
Clon 82	82Hu1	VH1	57	VK1	58
Clon 82	82Hu2	VH2	59	VK2	60
Clon 82	82Hu3	VH3	61	VK3	62
Clon 135	135Ch	VH	10	VK	11
Clon 135	135Hu1	VH1	12	VK1	13
Clon 135	135Hu2	VH2	14	VK2	15
Clon 135	135Hu3	VH3	16	VK3	17
Clon 53	53Ch	VH	38	VK	39
Clon 53	53Hu1	VH1	40	VK1	41
Clon 53	53Hu2	VH2	42	VK2	43
Clon 53	53Hu3	VH3	44	VK3	45
Clon 53	53Hu4	VH1	40	VK2	43
Clon 53	53Hu5	VH2	42	VK1	41

Clon	Anticuerpo	Cadena Pesada	SEQ ID NO de VH	Cadena ligera	SEQ ID NO de VK
Clon 53	53Hu6	VH2	42	VK4	49
Clon 53	53Hu7	VH2	42	VK5	50
Clon 53	53Hu8	VH2	42	VK6	51
Clon 53	53Hu9	VH2	42	VK7	52
Clon 53	53Hu10	VH2	42	VK8	53
Clon 53	53Hu11	VH2	42	VK9	54
Clon 53	53Hu12	VH4	46	VK2	43
Clon 53	53Hu13	VH5	47	VK2	43
Clon 53	53Hu14	VH6	48	VK2	43
Clon 53	53Hu15	VH1	40	VK4	49
Clon 53	53Hu16	VH1	40	VK6	51
Clon 53	53Hu17	VH6	48	VK4	49
Clon 53	53Hu18	VH6	48	VK6	51
Clon 53	53Hu19	VH7	63	VK10	67
Clon 53	53Hu20	VH7	63	VK11	68

Tabla 2

El término «interacción específica» o «se une específicamente», o similares, significa que dos moléculas forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una afinidad elevada y una capacidad baja a moderada. La unión no específica generalmente tiene una afinidad baja con una capacidad moderada a elevada. Típicamente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad K_a es mayor que 10^6 M^{-1} o, preferiblemente, mayor que 10^8 M^{-1} . En algunas realizaciones, los anticuerpos, variantes y fragmentos de estos se unen a su(s) antígeno(s) con una constante de asociación de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} o mayor. En algunas realizaciones, los anticuerpos, variantes y fragmentos de estos se unen a CXCR3 con al menos la cinética de unión que se muestra en una cualquiera de las Tablas 7A-B, 8-10 y/o 12. Si es necesario, la unión no específica se puede reducir sin afectar sustancialmente la unión específica al variar las condiciones de unión. Dichas condiciones se conocen en la técnica y un experto en la técnica puede seleccionar las condiciones adecuadas mediante el uso de técnicas de rutina. Las condiciones normalmente se definen en términos de concentración de anticuerpos, fuerza iónica de la disolución, temperatura, tiempo para la unión, concentración de moléculas de bloqueo, tales como seroalbúmina y caseína láctea.

En la presente se describen anticuerpos anti-CXCR3 que pueden, en algunas realizaciones, neutralizar el CXCR3. Un «anticuerpo neutralizante de CXCR3», se une a CXCR3 y bloquea la actividad del receptor, tal como las respuestas fisiológicas y genéticas típicas que resultan de la unión de los ligandos de CXCR3 a CXCR3. La actividad neutralizante puede ser completa (100 % de neutralización) o parcial, *p. ej.*, aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 (o cualquier porcentaje intermedio) o más de neutralización y dependerá de diversos factores conocidos para el experto en la técnica, tal como la concentración del anticuerpo, la afinidad y el epítipo, así como el ensayo específico usado para evaluar la actividad de neutralización. La actividad de neutralización de un anticuerpo neutralizante de CXCR3 se puede exhibir mediante ensayos para medir la inhibición de, *p. ej.*, la unión al ligando, la unión a GTP, la movilización de calcio, la quimiotaxia celular y/o la internalización del receptor. El experto en la técnica conoce numerosos ensayos para determinar la actividad de anticuerpos neutralizantes y, particularmente, el anticuerpo neutralizante de CXCR3, y se pueden adaptar fácilmente para verificar que un anticuerpo específico sea neutralizante.

Por ejemplo, la actividad neutralizante de un anticuerpo para su uso en los métodos de la invención se puede evaluar mediante un ensayo de quimiotaxia, sustancialmente como se establece en el prospecto del envase del anticuerpo producido mediante el clon 49801 y comercializado por R&D Systems® (n.º de cat. MAB160). La dosis de neutralización 50 (ND₅₀, por sus siglas en inglés) se define como la concentración de anticuerpo necesaria para producir la mitad de la inhibición máxima de la respuesta rhl-TAC mediada por CXCR3 en la superficie celular en una línea celular sensible, a una concentración de rhl-TAC específica. Para medir la capacidad del anticuerpo para bloquear la quimiotaxia inducida por rhl-TAC de células BaF/3 transfectadas con hCXCR3, se agrega rhl-TAC a 7 ng/mL al compartimento inferior de una cámara de quimiotaxia de 96 pocillos (NeuroProbe, Cabin John, MD). A continuación, la cámara de quimiotaxia se ensambla usando un filtro de policarbonato sin PVP (tamaño de poro 5µ). Se agregan diluciones en serie del anticuerpo (p. ej., de 0,001 a 10 000 µg/mL) y 0,25 x 10⁶ células/pocillo a los pocillos superiores de la cámara. Tras 3 horas de incubación a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %, la cámara se desensambla y las células que migran a través de la cámara inferior se transfieren a una placa de trabajo y se cuantifican usando, por ejemplo, fluorescencia de resazurina.

Colvin et al., Mol. Cell. Bio., 26: 5838-49 (2006) describen ensayos adicionales que se pueden usar, en ciertas realizaciones, para determinar la actividad neutralizante de anticuerpos neutralizantes de CXCR3 para su uso en la invención. De manera resumida, se pueden usar células 300-19, una línea celular de leucemia precélula B murina que expresa funcionalmente CXCR4. Tras la transfección, esta línea puede expresar funcionalmente otros receptores de quimiocina, p. ej., CXCR3 humano (véanse, p. ej., los párrafos 201-209 de la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0061983). Las células 300-19 que expresan CXCR3 humano se pueden cultivar en medio RPMI completo que contiene suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) al 10 %. Para evaluar la unión de los ligandos de CXCR3 a CXCR3 en presencia de anticuerpos neutralizantes de CXCR3 candidatos, se colocaron 400 000 células CXCR3/300-19 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos en un volumen total de 150 µL de tampón de unión (BSA al 0,5 %, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, 50 mM de HEPES, pH 7,4). Se puede agregar a las células un total de 0,04 nM de CXCL10 (New England Nuclear, Boston, MA) o CXCL11 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) etiquetados con ¹²⁵I y 5 x 10⁶ nM a 500 nM de CXCL10 o CXCL11 no etiquetados (Peptotech, Rocky Hill, NJ) e incubar durante 90 min a temperatura ambiente con agitación. Las células se transfieren a placas de filtro de 96 pocillos (Millipore, Billerica, MA) que se prerremojaron en polietilenoimina al 0,3 % y se lavaron tres veces con 200 µL de tampón de unión complementado con 0,5 M NaCl. Las placas se secan y se mide la radioactividad después de la adición del fluido de centelleo en un contador de centelleo Wallac Microbeta (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA). La unión de CXCL9 se puede evaluar de manera análoga a CXCL10 y 11.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden prevenir o reducir el flujo de calcio hacia células que expresan CXCR3. El flujo de calcio se puede detectar en células tales como células CXCR3/300-19. Se suspenden aproximadamente 5 x 10⁶ células en 2 ml de medio RPMI con BSA al 1 %. Se agregan quince microgramos de Fura-2 (Molecular Probes, Eugene, OR) y las células se incuban a 37 °C durante 20 min. Las células se lavan dos veces en PBS y se resuspenden en 2 ml de tampón de flujo de calcio (145 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1 mM de NaHPO₄, 1,8 mM de CaCl₂, 25 mM de HEPES, 0,8 mM MgCl₂ y 22 mM de glucosa). Las lecturas de fluorescencia se miden a 37 °C en un fluorímetro DeltaRAM (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ). Antes y después de la adición de las quimiocinas (p. ej., CXCL9, 10 o 11), se registran las concentraciones de calcio intracelular como la intensidad de fluorescencia de excitación emitida a 510 nm en respuesta a la excitación secuencial a 340 nm y 380 nm y presentada como la relación relativa de fluorescencia a 340 nm con respecto a 380 nm.

La neutralización de CXCR3 se puede evaluar al medir una reducción en la internalización del receptor. Los ensayos de internalización del receptor se pueden llevar a cabo al incubar aproximadamente 2,5 x 10⁵ células, tales como células CXCR3/300-19 en medio RPMI con BSA al 1 % con diversas concentraciones de CXCL10, CXCL11 o CXCL9 durante 30 min a 37 °C. A continuación, las células se pueden lavar con tampón separador de células activado por fluorescencia helado y posteriormente analizarse para determinar la expresión superficial de CXCR3 usando un anticuerpo para CXCR3 conjugado con PE.

Se describen ensayos adicionales para evaluar la actividad neutralizante en, por ejemplo, los Ejemplos 2-4 de la patente estadounidense n.º 7.405.275.

Según se somete a ensayo mediante cualquiera de los ensayos mencionados anteriormente, un anticuerpo neutralizante de CXCR3 puede tener una ND₅₀ de aproximadamente 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 40, 50 o 100 µg/mL. Preferiblemente, la ND₅₀ puede ser de 0,5-12 µg/mL y, más preferiblemente, 1-6 µg/mL.

Los anticuerpos para CXCR3 aislados descritos en la presente memoria pueden incluir aquellos que se unen a epítopos específicos de CXCR3. Por ejemplo, los anticuerpos para su uso en la invención pueden unirse a un péptido que comprende todo o parte (p. ej., un fragmento de al menos 5, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18 o 20 residuos) de una secuencia seleccionada de los residuos 1-58, 1-16 o 1-37 de la SEQ ID NO:1. Los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen aquellos que se unen a uno o más de los epítopos identificados en la Figura 18. Un anticuerpo anti-CXCR3 puede comprender un anticuerpo que se une a un epítipo de CXCR3 que comprende SDHQVLNDAE. En algunas realizaciones, el epítipo comprende SDHQVLND, DHQVLND y/o VLNDAE. El epítipo puede comprender la secuencia VLND. El epítipo puede comprender XDXXVXNDXX, donde X indica cualquier

aminoácido. El epítipo puede comprender XXXVXND, DXXVXND y/o VXNDXX, donde X indica cualquier aminoácido. El epítipo puede comprender la secuencia VXND, donde X indica cualquier aminoácido.

Los anticuerpos anti-CXCR3 pueden ser panespecíficos para secuencias de CXCR3 de diferentes especies o selectivos para secuencias de CXCR3 de una especie específica o un isotipo específico de CXCR3. El anticuerpo para CXCR3 puede ser específico para la especie del sujeto al cual se administra. Por consiguiente, un anticuerpo para CXCR3 puede ser específico para una secuencia de CXCR3 humano (p. ej., capaz de unirse a un péptido que comprende una secuencia homóloga a cualquiera de las subsecuencias de SEQ ID NO:1 indicada anteriormente). Un experto en la técnica identificará fácilmente la secuencia homóloga por medios tales como alineaciones de secuencias proteicas (p. ej., BLASTp, ClustalW, *etcétera*). Un anticuerpo para su uso en la invención puede unirse a un péptido que comprende una secuencia al menos 90, 95 o 99 % (o cualquier porcentaje intermedio) similar o idéntica a la SEQ ID NO:1 a lo largo de toda la longitud de la secuencia o una ventana de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70 residuos (o cualquier valor intermedio). El anticuerpo puede ser capaz de unirse a un epítipo al menos 80, 85, 90, 95 o 99 % (o cualquier porcentaje intermedio) similar o idéntico a uno de los epítipos descritos anteriormente (véase también la Figura 18).

Los anticuerpos específicos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, los clones de anticuerpo (CI) 12, CI 135, CI 82, CI 53 y CI 4, así como sus variantes quiméricas y humanizadas.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden exhibir ciertas propiedades mejoradas con respecto a anticuerpos conocidos en la técnica, incluidos los anticuerpos 5H7 y 7H5 (descritos en, p. ej., la patente estadounidense n.º 7.405.275; las CDR para los anticuerpos se describe en las Tablas 1 y 2 y en el listado de secuencias mencionado); V44D7 (descrito en la publicación internacional WO 2008/094942), 1C6 (descrito en la patente estadounidense n.º 7.407.655; con el mapeo del epítipo descrito en los Ejemplos 8 y 9), y 49801, comercializado por R&D Sistema con el n.º de catálogo MAB160.

En algunas realizaciones, los clones de anticuerpo descritos en la presente memoria (clones 4, 12, 53, 82 y 135 y sus contrapartes quiméricas y humanizadas) exhiben ciertos beneficios sorprendentes con respecto a los anticuerpos conocidos 5H7, 7H5, V44D7, 1C6 y 49801. Por ejemplo, los clones descritos en la presente memoria exhibir mayor afinidad de unión en comparación con los clones anti-hCXCR3 5H7, 7H5, V44D7, 1C6 y 49801. Los clones humanizados descritos en la presente memoria también pueden tener una inmunogenicidad reducida en comparación con los clones anti-hCXCR3 de ratón 5H7, 7H5, V44D7, 1C6 y 49801. Además, los anticuerpos descritos en la presente memoria, tales como los que comprenden los clones de cadena pesada 4.7-4.11 se han optimizado mediante modificación en las posiciones 58 y 59 (usando la numeración de IMGT) para retirar un sitio de desamidación para potenciar la estabilidad. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria conservan actividad neutralizante de CXCR3.

Los anticuerpos o fragmentos descritos en la presente memoria pueden comprender secuencias de CDR de VH y/o VL que son aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 % (p. ej., aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idénticas a las secuencias de CDR de VH y/o VL en uno cualquiera de los anticuerpos CI 12, CI 135, CI 82, CI 53 y CI 4 o en las variantes quiméricas o humanizadas de estos clones (p. ej., 80-100 % idénticas a las seis CDR en CI 12, o a las seis CDR en CI 12.1, etc.). Los anticuerpos o fragmentos pueden comprender secuencias de CDR de VH y VL que contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos (incluidas adiciones, supresiones y sustituciones, tales como sustituciones conservadoras) con respecto a las secuencias de CDR de VH y/o VL en uno cualquiera de los anticuerpos CI 12, CI 135, CI 82, CI 53 y CI 4.

Según se usan en la presente memoria, los términos «porcentaje (%) de identidad de secuencia» u «homología» se definen como el porcentaje de residuos aminoacídicos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos o a los nucleótidos en las secuencias de referencia después de alinear las secuencias e introducir los espacios, si es necesario, para obtener el porcentaje de identidad de secuencia máximo, y excluidas las sustituciones de ácido nucleico conservadoras. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede producir, además de manualmente, por medio de algoritmos de homología locales conocidos en la técnica o por medio de programas informáticos que usan estos algoritmos (p. ej., BLAST P).

Un anticuerpo para CXCR3 o fragmento de unión a antígeno aislado, según se describen en la presente memoria, puede comprender una secuencia de aminoácidos de VH que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (o cualquier porcentaje intermedio) de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las cadenas pesadas 4.0-4.11, las cadenas pesadas 12.0-12.3, las cadenas pesadas 53.0-53.10, las cadenas pesadas 82.0-82.3 y las cadenas pesadas 135.0-135.3. El anticuerpo o fragmento puede comprender una secuencia de aminoácidos de VH que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones (incluidas adiciones, supresiones y sustituciones, así como sustituciones conservadoras) en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera SEQ de las cadenas pesadas 4.0-4.11, las cadenas pesadas 12.0-12.3, las cadenas pesadas 53.0-53.10, las cadenas pesadas 82.0-82.3 y las cadenas pesadas 135.0-135.3. Según se usa en la presente memoria, una «sustitución conservadora» se refiere al reemplazo de un primer aminoácido mediante un segundo aminoácido que no altera sustancialmente las propiedades químicas, físicas y/o funcionales del anticuerpo o fragmento (p. ej., el

anticuerpo o fragmento conserva la misma carga, estructura, polaridad, hidrofobicidad/hidrofilicidad y/o conserva funciones tales como la capacidad para reconocer, unirse a y/o neutralizar la actividad de CXCR3).

Un anticuerpo para CXCR3 o fragmento de unión a antígeno aislado, según se describen en la presente memoria, puede comprender una secuencia de aminoácidos de VL que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (o cualquier porcentaje intermedio) de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las cadenas ligeras 4.0-4.7, las cadenas ligeras 12.0-12.3, las cadenas ligeras 53.0-53.13, las cadenas ligeras 82.0-82.3 y las cadenas pesadas 135.0-135.3. El anticuerpo o fragmento puede comprender una secuencia de aminoácidos de VL que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones (incluidas adiciones, supresiones y sustituciones, así como sustituciones conservadoras) en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las cadenas ligeras 4.0-4.7, las cadenas ligeras 12.0-12.3, las cadenas ligeras 53.0-53.13, las cadenas ligeras 82.0-82.3 y las cadenas ligeras 135.0-135.3.

Un anticuerpo para CXCR3 o fragmento de unión a antígeno aislado, según se describen en la presente memoria, puede comprender un dominio variable de cadena pesada que comprende al menos 80 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las cadenas pesadas 4.0-4.11, las cadenas pesadas 12.0-12.3, las cadenas pesadas 53.0-53.10, las cadenas pesadas 82.0-82.3 y las cadenas pesadas 135.0-135.3, y comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende al menos 80 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las cadenas ligeras 4.0-4.7, las cadenas ligeras 12.0-12.3, las cadenas ligeras 53.0-53.13, las cadenas ligeras 82.0-82.3 y las cadenas pesadas 135.0-135.3. Las cadenas pesada y ligera se pueden seleccionar de manera que una cadena pesada de un clon específico (p. ej., una cadena pesada del clon 4) se aparee con cualquiera de las cadenas ligeras de dicho clon (p. ej., una cadena ligera del clon 4). Las cadenas pesada y ligera se pueden aparear según se muestra en la Tabla 2. El anticuerpo o fragmento que comprende las secuencias de VH y/o VL descritas puede retener la capacidad de neutralizar la actividad de CXCR3.

El anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser una variante humanizada de Cl 12, 135, 82, 53 y/o 4. El anticuerpo puede ser completamente humano. El anticuerpo puede ser un derivado humanizado o completamente humano de un anticuerpo seleccionado de los clones 12, 135, 82, 53 y 4. El anticuerpo puede tener una constante de afinidad de al menos 10^8 M^{-1} (p. ej., al menos 10^8 M^{-1} , al menos 10^9 M^{-1} , al menos 10^{10} M^{-1} o al menos 10^{11} M^{-1} , o cualquier valor intermedio). Puede ser capaz de unirse a todas las isoformas de CXCR3. El anticuerpo puede ser capaz de unirse a las isoformas A y B de CXCR3. Alternativamente, el anticuerpo no se une a la isoforma B de CXCR3.

Un anticuerpo para CXCR3 o fragmento de unión a antígeno aislado puede comprender la CDR1 de VH, la CDR2 de VH, la CDR3 de VH, la CDR1 de VL, la CDR2 de VL y/o la CDR3 de VL que comprenden las secuencias de aminoácidos aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 % (p. ej., aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idénticas a las secuencias de CDR de VH y VL de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas. Un anticuerpo para CXCR3 o fragmento de unión a antígeno aislado puede comprender la CDR1 de VH, la CDR2 de VH, la CDR3 de VH, la CDR1 de VL, la CDR2 de VL y/o la CDR3 de VL que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas o que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones de residuo aminoacídico (incluidas adiciones, supresiones y sustituciones, tales como sustituciones conservadoras) con respecto a las secuencias de CDR de VH y VL de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas.

El anticuerpo anti-CXCR3 o fragmento puede comprender una cadena pesada que tiene tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada) y una cadena ligera que tiene tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera). La CDR1 de VH puede tener 1, 2 o 3 mutaciones aminoacídicas con respecto a la secuencia de CDR1 de VH de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas. La CDR2 de VH puede tener 1, 2 o 3 mutaciones aminoacídicas con respecto a la secuencia de CDR2 de VH de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas. La CDR3 de VH puede tener 1, 2 o 3 mutaciones aminoacídicas con respecto a la secuencia de CDR3 de VH de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas. La CDR1 de VL puede tener 1, 2 o 3 mutaciones aminoacídicas con respecto a la secuencia de CDR1 de VL de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas. La CDR2 de VL puede tener 1 o 2 mutaciones aminoacídicas con respecto a la secuencia de CDR2 de VL de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas. La CDR3 de VL puede tener 1, 2 o 3 mutaciones aminoacídicas con respecto a la secuencia de CDR3 de VL de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas. Las CDR 1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y ligera pueden ser las CDR de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas, o pueden comprender 1-3 mutaciones aminoacídicas con respecto a la CDR establecida en el seleccionado de uno cualquiera de los clones de anticuerpo o sus variantes quiméricas/humanizadas. Las mutaciones pueden estar en las posiciones resaltadas que se muestran en las alineaciones en las Figuras 17A-H. La mutación puede estar en una o más de las posiciones 58 y 59 en la CDR2 de VH de uno cualquiera de los clones 4.0-4.11.

El anticuerpo anti-CXCR3 o fragmento puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera. La cadena pesada puede ser al menos aproximadamente 90 % idéntica (p. ej., al menos aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica, o cualquier porcentaje intermedio) o puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10

mutaciones aminoacídicas con respecto a una cualquiera de las cadenas pesadas 4.0-4.11, las cadenas pesadas 12.0-12.3, las cadenas pesadas 53.0-53.10, las cadenas pesadas 82.0-82.3 y las cadenas pesadas 135.0-135.3. La cadena ligera puede ser al menos aproximadamente 90 % idéntica (p. ej., al menos aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica, o cualquier porcentaje intermedio) o puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones aminoacídicas con respecto a una cualquiera de las cadenas ligeras 4.0-4.7, las cadenas ligeras 12.0-12.3, las cadenas ligeras 53.0-53.13, las cadenas ligeras 82.0-82.3 y las cadenas ligeras 135.0-135.3. La cadena pesada puede ser al menos aproximadamente 90 % idéntica (p. ej., al menos aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica, o cualquier porcentaje intermedio) o puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones aminoacídicas con respecto a una cualquiera de las cadenas pesadas 4.0-4.11, las cadenas pesadas 12.0-12.3, las cadenas pesadas 53.0-53.10, las cadenas pesadas 82.0-82.3 y las cadenas pesadas 135.0-135.3 y/o la cadena ligera es al menos aproximadamente 90 % idéntica (p. ej., al menos aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica, o cualquier porcentaje intermedio) o tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones aminoacídicas con respecto a una cualquiera de las cadenas ligeras 4.0-4.7, las cadenas ligeras 12.0-12.3, las cadenas ligeras 53.0-53.13, las cadenas ligeras 82.0-82.3 y las cadenas ligeras 135.0-135.3. Las mutaciones pueden estar en las posiciones que se muestran en las alineaciones en las Figuras 17A-H.

Un anticuerpo para CXCR3 o fragmento de unión a antígeno aislado que comprende las secuencias de CDR de VH y/o VL descritas anteriormente puede conservar la actividad neutralizante de CXCR3.

Los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo para CXCR3 o fragmento pueden comprender al menos una región de marco (p. ej., al menos una de FR1, FR2, FR3 y FR4). Las regiones de marco de la cadena pesada se designan FR de VH, mientras que las regiones de marco de la cadena ligera se designan en la presente FR de VL. Las regiones de marco pueden contener sustituciones, inserciones u otras alteraciones. Las alteraciones pueden resultar en una mejora u optimización de la afinidad de unión del anticuerpo. Los ejemplos no limitantes de residuos de región de marco que se pueden modificar incluyen aquellos que se unen no covalentemente a CXCR3 directamente, interactúan con o producen la conformación de una CDR y/o participan en la interfaz VL-VH.

La cadena pesada (VH) de un anticuerpo para CXCR3 o fragmento puede comprender FR1, FR2, FR3 y/o FR4 que tienen las secuencias de aminoácidos que son aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 % idénticas (p. ej., 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, o cualquier porcentaje intermedio) a las regiones de marco de VH correspondientes dentro de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químéricas y humanizadas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo para CXCR3 o fragmento puede comprender al menos una FR de VH (FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones de aminoácidos (incluidas adiciones, supresiones y sustituciones, tales como sustituciones conservadoras) con respecto a, las regiones FR de VH correspondientes dentro de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químéricas y humanizadas.

La cadena ligera (VL) de un anticuerpo para CXCR3 o fragmento puede comprender FR1, FR2, FR3 y/o FR4 que tienen las secuencias de aminoácidos que son aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 % idénticas (p. ej., 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, o cualquier porcentaje intermedio) a las regiones de marco de VL correspondientes dentro de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químéricas y humanizadas. Un anticuerpo para CXCR3 o fragmento puede comprender al menos una FR de VL (FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a, o que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones de aminoácidos (incluidas adiciones, supresiones y sustituciones, tales como sustituciones conservadoras) con respecto a, las regiones FR de VL correspondientes dentro de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químéricas y humanizadas.

Un anticuerpo para CXCR3 o fragmento puede comprender regiones FR de VH (FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que tienen secuencias de aminoácidos idénticas a, o que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones de aminoácidos con respecto a, las regiones FR de VH correspondientes dentro de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químéricas y humanizadas, y comprende regiones FR de VL (FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que tienen secuencias de aminoácidos idénticas a, o que comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones de aminoácidos con respecto a, las regiones FR de VL correspondientes dentro de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químéricas y humanizadas. Un anticuerpo para CXCR3 o fragmento puede comprender regiones FR de VH (FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que tienen secuencias de aminoácidos aproximadamente 80-100 % idénticas a las regiones FR de VH correspondientes dentro de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químéricas y humanizadas, y comprende regiones FR de VL (FR1, FR2, FR3 y/o FR4) que tienen secuencias de aminoácidos aproximadamente 80-100 % idénticas a las regiones FR de VL correspondientes dentro de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químéricas y humanizadas.

Las regiones CDR y FR descritas en la presente memoria pueden combinarse en una variedad de combinaciones, dado que cada una de las regiones CDR y FR puede seleccionarse independientemente y combinarse con cualquier otra región CDR o FR para un anticuerpo dado. En ciertas realizaciones, las secuencias de CDR y FR de VH y/o VL pueden estar presentes en cualquier combinación en un anticuerpo o fragmento que conserva la capacidad de neutralizar la actividad de CXCR3.

Los anticuerpos y fragmentos, según se describen en la presente memoria, pueden comprender una o más secuencias de aminoácidos que no alteran sustancialmente las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria. Las secuencias de aminoácidos que son sustancialmente las mismas incluyen secuencias que comprenden sustituciones de aminoácidos conservadoras, así como supresiones y/o inserciones de aminoácidos que no alteran la capacidad del anticuerpo o fragmento de neutralizar la actividad de CXCR3.

Los anticuerpos y fragmentos descritos en la presente memoria pueden conjugarse adicionalmente a una o más moléculas adicionales. Por ejemplo, un conjugado puede comprender un anticuerpo unido directamente o a través de un enlazador a uno o más agentes terapéuticos, agentes de solubilización, agentes de estabilización, inmunosupresores, receptores y fragmentos de estos, péptidos de unión a antígeno y/u otros restos dirigidos a ligandos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente útil para tratar la T1D y/u otros trastornos asociados a CXCR3. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento se conjuga con un agente estimulante de células β o insulina.

Secuencias nucleotídicas

Además de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente, en la presente memoria se describen secuencias nucleotídicas correspondientes a dichas secuencias de aminoácidos. Una secuencia nucleotídica puede codificar un anticuerpo o fragmento capaz de neutralizar la actividad de CXCR3. Las secuencias nucleotídicas se pueden usar para preparar vectores de expresión para la expresión de anticuerpos anti-CXCR3 en células (p. ej., expresión en células de mamíferos).

También se describen en la presente memoria polinucleótidos sustancialmente idénticos a los que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria. Las secuencias sustancialmente idénticas pueden ser secuencias polimórficas, *es decir*, secuencias o alelos alternativos en una población. Las secuencias sustancialmente idénticas también pueden comprender secuencias mutagenizadas, incluidas secuencias que comprenden mutaciones silenciosas. Una mutación puede comprender uno o más cambios en residuos nucleotídicos, una supresión de uno o más residuos nucleotídicos o una inserción de uno o más residuos nucleotídicos adicionales. Las secuencias sustancialmente idénticas también pueden comprender diversas secuencias nucleotídicas que codifican el mismo aminoácido en cualquier posición de aminoácido dada en una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria, debido a la degeneración del código de ácido nucleico. También se incluyen en las secuencias sustancialmente idénticas secuencias que codifican una cadena o cadenas de un anticuerpo que conserva la capacidad de neutralizar CXCR3.

También se describen en la presente memoria, cualesquiera polinucleótidos que se hibridan en condiciones de hibridación de elevada rigurosidad o baja rigurosidad a polinucleótidos que codifican un anticuerpo o fragmento neutralizante de CXCR3. El término «rigurosidad», según se usa en la presente memoria, se refiere a condiciones experimentales (p. ej., temperatura y concentración de sal) de un experimento de hibridación llevado a cabo para evaluar el grado de homología entre dos ácidos nucleicos; cuanto mayor es la rigurosidad, mayor será el porcentaje de homología entre dos ácidos nucleicos. Según se usa en la presente memoria, la frase «hibridar» o sus variaciones gramaticales, hace referencia a la unión de una primera molécula de ácido nucleico a una segunda molécula de ácido nucleico en condiciones de rigurosidad alta, media o baja o en condiciones de síntesis de ácido nucleico. La hibridación puede incluir casos donde una primera molécula de ácido nucleico se une a una segunda molécula de ácido nucleico, y donde la primera y segunda moléculas de ácido nucleico son complementarias.

Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, hibridación con ADN unido a filtro en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 grados Celsius, posteriormente uno o más lavados en 0,2X SSC/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 grados Celsius. Otras condiciones rigurosas incluyen hibridación con ADN unido a filtro en 6X SSC a aproximadamente 45 grados Celsius, posteriormente uno o más lavados en 0,1X SSC/SDS al 0,2 % a aproximadamente 65 grados Celsius. Los expertos en la técnica están familiarizados con otras condiciones de hibridación de rigurosidad conocida y se incluyen en la presente memoria.

Un ácido nucleico, según se describe en la presente memoria, puede codificar la secuencia de aminoácidos de una cadena o cadenas en un anticuerpo o fragmento capaz de neutralizar la actividad de CXCR3, o el ácido nucleico puede hibridarse en condiciones rigurosas con un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una cadena o cadenas en el anticuerpo o fragmento.

En la presente memoria se describe una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo o fragmento neutralizante de CXCR3, y que es al menos aproximadamente 80-100 %, (p. ej., aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica (o cualquiera porcentaje intermedio) a la secuencia nucleotídica que codifica la cadena pesada de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químicas y humanizadas. La secuencia de polinucleótidos puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones (incluidas adiciones, supresiones y sustituciones, tales como sustituciones conservadoras) con respecto a la secuencia nucleotídica que codifica la cadena pesada de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes químicas y humanizadas.

En la presente memoria se describe una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos de un dominio VL de un anticuerpo o fragmento neutralizante de CXCR3, y que es al menos aproximadamente 80-100 %, (p. ej., aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica (o cualquiera porcentaje intermedio) a la secuencia nucleotídica que codifica la cadena ligera de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas. La secuencia de polinucleótidos puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones (incluidas adiciones, supresiones y sustituciones, tales como sustituciones conservadoras) con respecto a la secuencia nucleotídica que codifica la cadena ligera de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas.

En la presente memoria se describe una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica (o cualquiera porcentaje intermedio) a una secuencia de aminoácidos de VH y al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica (o cualquiera porcentaje intermedio) a una secuencia de aminoácidos de VL, donde las secuencias nucleotídicas codifican las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de uno cualquiera de los clones 12, 135, 82, 53 y 4 y sus variantes quiméricas y humanizadas.

Los polinucleótidos descritos pueden obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia nucleotídica de un anticuerpo, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente. Esto implicaría, por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, el apareamiento y ligadura de dichos oligonucleótidos y, después, la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR. Los polinucleótidos descritos también se pueden generar a partir de cualquier otra fuente adecuada de ácidos nucleicos, tal como una biblioteca de ADNc de anticuerpo, o una biblioteca de ADNc aislada a partir de cualquier tejido o células que expresen el anticuerpo (p. ej., de células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo).

Cualquiera de los polinucleótidos descritos puede incorporarse en un vector de expresión. Los vectores adecuados para la expresión en diversos tipos de células humanas y animales se conocen en la técnica. La descripción proporciona células hospedantes que comprenden los vectores. Las células hospedantes adecuadas incluyen, p. ej., CHO, COS, SF9 y/u otras líneas celulares humanas o no humanas. Las células hospedantes expresan de manera transitoria o estable el ácido nucleico en el vector cuando se cultivan en medio de cultivo y proporcionan, de esta manera, un método para producir los anticuerpos o fragmentos descritos en la presente memoria.

Composiciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica puede comprender cualesquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria, o fragmentos de estos. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos de estos, p. ej., para su uso en aplicaciones de tratamiento génico y/o para expresión transitoria o estable en células hospedantes (p. ej., CHO, COS, SF9 y/u otras líneas celulares humanas o no humanas) para producir las proteínas o fragmentos de estas.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o al menos un aditivo tal como un disolvente, carga, agente espesante, desintegrante, tampón o estabilizador. Las técnicas de formulación farmacéutica estándares son conocidas para los expertos en la técnica (véanse, p. ej., 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20a ed., Gennado et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000). Los aditivos farmacéuticos adecuados incluyen, p. ej., manitol, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, maltosa, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden contener también reactivos de tamponado de pH y agentes humectantes o emulsionantes (p. ej., disolución salina tamponada con fosfato, disolución salina para inyección, etc.). Las composiciones pueden contener conservantes u otros estabilizadores.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden cualesquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria, o fragmentos de estos, o ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos, pueden comprender, además, uno o más de los siguientes: manitol, polisorbato 80, fosfato sódico dibásico heptahidratado y fosfato sódico monobásico monohidratado. En otra realización, las composiciones farmacéuticas pueden contener 10mM de Histidina, pH 6,5, con hasta 2 % de glicina, hasta 2 % de manitol y hasta 0,01 % de polisorbato 80.

La formulación de las composiciones farmacéuticas puede variar dependiendo de las vías de administración previstas y otros parámetros (véase, p. ej., Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th ed., APHA Publications, 2003.) La composición farmacéutica puede ser una torta o polvo liofilizado. La composición liofilizada puede reconstituirse para administración por inyección intravenosa, por ejemplo, con agua estéril para inyección, USP. La composición puede ser una disolución estéril, no pirógena.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender un anticuerpo según se describe en la presente memoria, o un fragmento de este, o ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos, como el único compuesto activo, o la composición farmacéutica puede comprender una combinación con otro compuesto, composición o material biológico. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender también una o más moléculas pequeñas u otros agentes útiles para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con CXCR3, tal como T1D. La composición farmacéutica puede comprender un agente estimulante de células β , insulina y/o una célula productora de insulina. La composición farmacéutica también puede comprender uno o más inmunosupresores, inhibidores de mTOR o inhibidores de autofagia. Los ejemplos de inmunosupresores incluyen rapamicina y velcade. La rapamicina es también un inhibidor de mTOR.

Administración y dosificación

En la presente memoria se describe un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad o trastorno asociado a CXCR3 que comprende administrar al paciente uno o más de los anticuerpos anti-CXCR3 descritos en la presente memoria, y/o un fragmento de estos. Según se describe en la presente memoria, el anticuerpo o fragmento puede ser capaz de neutralizar CXCR3. Según se describe en la presente memoria, la enfermedad o trastorno puede ser un trastorno inflamatorio. Según se describe en la presente memoria, el trastorno puede ser T1D. Según se describe en la presente memoria, administrar una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que comprende el anticuerpo o fragmento puede prevenir, tratar, reducir la gravedad y/o de cualquier otra manera mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno asociado a CXCR3. Según se describe en la presente memoria, el anticuerpo o fragmento se puede administrar a una dosis y frecuencia suficientes para prevenir, tratar, reducir la gravedad y/o de cualquier otra manera mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno asociado a CXCR3.

En ciertos ejemplos, se proporciona una composición para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno, en donde el medicamento comprende cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria, o fragmentos de estos. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento puede comprender las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 4.0-4.11 apareadas con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 4.0-4.7; las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 12.0-12.3 apareadas con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 12.0-12.3; las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 53.0-53.10 apareadas con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 53.0-53.13; las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 82.0-82.3 apareadas con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 82.0-82.3; o las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 135.0-135.3 apareadas con las tres CDR de uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 135.0-135.3.

El anticuerpo o fragmento en el medicamento puede comprender uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 4.0-4.11 apareados con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 4.0-4.7, uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 12.0-12.3 apareados con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 12.0-12.3, uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 53.0-53.10 apareados con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 53.0-53.13, uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 82.0-82.3 apareados con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 82.0-82.3 o uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada 135.0-135.3 apareados con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera 135.0-135.3.

Las dosis del anticuerpo CXCR3 para su uso en los métodos descritos en la presente memoria variarán en función de numerosos parámetros conocidos para el experto en la técnica, tal como la fisiología del paciente (tamaño o área superficial, peso, edad y metabolismo) y el estado de la enfermedad, así como parámetros farmacológicos, tales como el mecanismo de suministro, la formulación y cualesquiera tratamientos simultáneos o secuenciales. Una «cantidad eficaz» de anticuerpo para CXCR3 puede producir un efecto *in vivo* deseado tal como uno o más de mantenimiento o disminución de los niveles de HA1bc (hemoglobina A1c) (menos de aproximadamente 7 %, p. ej., menos de 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, 7,1, 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6 o 6,5 %, o cualquier porcentaje intermedio), producción de insulina endógena y/o niveles de insulina circulante aumentados, mantenimiento o aumento de niveles de péptido C en ayunas, tolerancia a la glucosa mejorada, niveles de glucosa en sangre en ayunas reducidos en ausencia de insulina exógena, reducción del uso de insulina exógena, reducción de inflamación por células β y/o aumento de la población y/o el crecimiento de células β . También se pueden usar ensayos celulares directos para determinar la inhibición de CXCR3, tal como una reducción en la sangre de células CXCR3+ (incluidos, pero sin limitarse a, linfocitos T), inhibición de unión al ligando de CXCR3, unión a GTP, flujo y/o movilización de calcio, quimiotaxis celular e/o internalización de receptor.

Una cantidad eficaz de anticuerpo para CXCR3 puede resultar en aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % (o cualquier porcentaje intermedio) o 1, 2, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 100 veces (o cualquier cantidad intermedia), o más, de mejora en cualquiera de los parámetros *in vivo* mencionados anteriormente, con respecto a los testigos. Una mejora se puede caracterizar por un nivel de glucosa en sangre en ayunas en ausencia de insulina exógeno que se reduce por debajo de 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 300 o 350 mg/dL (o cualquier valor intermedio). Una mejora se puede caracterizar por un aumento en

los niveles séricos basales de péptido C a más de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 o 1,0 nmol/L (o cualquier valor intermedio). Una mejora se puede caracterizar por un aumento en los niveles séricos integrados de péptido C en ayunas durante una exposición a péptido C (prueba de tolerancia a la glucosa posoral) a más de aproximadamente 0,03, 0,033, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 o 1,0 nmol/L x min (o cualquier valor intermedio). La dosis eficaz de anticuerpo para CXCR3 puede caracterizarse, además, por reducir la concentración de células CD4+ y/o CD8+ en el páncreas en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % (o cualquier porcentaje intermedio) o al menos 1, 2, 3, 4 o 5 veces (o cualquier valor intermedio) con respecto a los sujetos testigo.

Una dosis eficaz de anticuerpo también puede seleccionarse para que sea una dosis segura para administración a un sujeto humano. Una dosis segura de anticuerpo anti-CXCR3 se puede caracterizar como una que no resulta en una reducción sustancial considerable de linfocitos T o actividad de linfocitos T (distinta de la actividad de CXCR3) en el sujeto (p. ej., según se mide mediante la concentración o actividad de linfocitos T en la sangre del sujeto). En ejemplos específicos, «reducción no sustancial considerable de linfocitos T o actividad de linfocitos T» significa una reducción de 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % (o cualquier porcentaje intermedio) o menos en la concentración y/o actividad (distinta de la actividad de CXCR3) de células CD4+ y/o CD8+ en el sujeto tratado con el anticuerpo neutralizante de CXCR3, con respecto a los sujetos testigo tratados con placebo y/o con respecto a sujetos del tratamiento antes del tratamiento. En algunos casos, la dosis segura se caracteriza, además, por una reducción de 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % (o cualquier porcentaje intermedio) o menos en la concentración de uno o más tipos celulares seleccionados de linfocitos T reguladores, linfocitos B, células mieloides, células dendríticas y/o granulocitos, con respecto a los sujetos testigo.

Las dosis no limitantes ilustrativas para un sujeto, tal como un humano, incluyen aproximadamente 0,03, 0,06, 0,12, 0,24, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 o 3,7 mg/kg/dosis (o cualquier valor intermedio) para un anticuerpo con una ND₅₀ de aproximadamente 1-6 µg/mL en un ensayo de quimiotaxia *in vitro*. Según se describe en la presente memoria, el anticuerpo se puede administrar en un intervalo de aproximadamente 0,03-3,7 mg/kg/dosis, 0,15-0,7 mg/kg/dosis o 0,25-0,5 mg/kg/dosis.

El anticuerpo anti-CXCR3 se puede administrar en una única administración o en administraciones repetidas a lo largo de diferentes períodos de tiempo, tal como diariamente, semanalmente, bisemanalmente, mensualmente, bimensualmente, trimestralmente o anualmente. Por consiguiente, en un ejemplo no limitante basado en los intervalos de dosificación descritos anteriormente, un paciente puede recibir una dosis total aproximada de 0,16-18 mg/kg de anticuerpo para CXCR3 en el transcurso de un régimen de tratamiento.

Los anticuerpos anti-CXCR3 se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado conocido para el experto en la técnica, incluido, por ejemplo, intravenoso, intraperitoneal, nasal, ocular, oral, parenteral, subcutáneo o transdérmico. Según se describe en la presente memoria, el anticuerpo se puede administrar directamente al páncreas del sujeto o próximo al páncreas o a regiones específicas del páncreas, tal como las células de los islotes del páncreas.

Las dosificaciones eficaces obtenidas en un animal se pueden convertir para su uso en otro animal, incluidos humanos, mediante el uso de factores de conversión conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Reagan-Shaw et al., FASEB J. 22:659-61 (2008); Schein et al., Clin. Pharmacol. Ther. 11: 3-40 (1970); y Freireich et al., Cancer Chemother. Reports 50(4):219-244 (1966). Por ejemplo, la dosificación equivalente para humano (HED, por sus siglas en inglés) en mg/kg basada en la dosificación para animal se puede proporcionar mediante la siguiente ecuación: HED (mg/kg) = dosis para animal (mg/kg) X (Km^{animal}/Km^{humano}), donde Km = peso/área superficial (kg/ m²).

Los factores de conversión ilustrativos basados en la ecuación anterior se muestran en la siguiente tabla. Las dosis ilustrativas proporcionadas anteriormente para un humano se pueden ajustar para otras especies u otros pacientes humanos en función de estos coeficientes u otros medios conocidos para el experto en la técnica.

Tabla 3

De: Para:	Ratón (20 g)	Rata (150 g)	Mono (3,5 kg)	Perro (8 kg)	Humano (60 kg)
Ratón	1	0,5	0,25	0,17	0,08
Rata	2	1	0,5	0,25	0,14
Mono	4	2	1	0,6	0,33
Perro	6	4	1,7	1	0,5
Humano	12	7	3	2	1

Sujetos

Los sujetos que van a tratarse mediante los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir humanos o animales, tales como ganado, animales domésticos y salvajes. Los animales pueden ser aves, bovinos, caninos, cetáceos, equinos, felinos, ovinos, peces, porcinos, primates, roedores o ungulados. Los sujetos pueden estar en

cualquier etapa de desarrollo, incluidos adultos, jóvenes, fetos o embriones. Preferiblemente, el paciente es un mamífero y, más preferiblemente, un humano.

Según se describe en la presente memoria, un sujeto puede tratarse profilácticamente o después de la aparición de cualquier afección asociada a la actividad aberrante de CXCR3 o cualquier afección en la que la interrupción de la señalización de CXCR3 podría ser terapéuticamente beneficiosa. Según se describe en la presente memoria, un sujeto puede tratarse profilácticamente o después de la aparición de la T1D. Según se describe en la presente memoria, un sujeto puede tratarse profilácticamente antes de la aparición de la T1D mediante el uso de los métodos proporcionados en la presente memoria, o un sujeto que padece T1D de aparición reciente puede tratarse mediante el uso de los métodos proporcionados en la presente memoria.

«Un sujeto que padece T1D de aparición reciente» es cualquier sujeto que tiene una capacidad de producción de insulina por las células β del páncreas disminuida, pero todavía detectable, independientemente de la edad del sujeto cuando la diabetes se diagnostica clínicamente (p. ej., incluidos sujetos adultos, jóvenes, fetos o embriones). Según se describe en la presente memoria, un sujeto que padece T1D de aparición reciente puede recibir tratamiento preferiblemente en aproximadamente los seis meses (p. ej., en aproximadamente 1 día, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o cualquier tiempo intermedio) posteriores al diagnóstico clínico más temprano de T1D. Según se describe en la presente memoria, el sujeto puede recibir tratamiento más de seis meses después del diagnóstico clínico más temprano de T1D, en donde el sujeto conserva los niveles séricos basales de péptido C mínimos, pero medibles mayores o iguales que aproximadamente 0,2 nmol/L (p. ej., al menos aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 o 1,0 nmol/L). Según se describe en la presente memoria, el tratamiento puede comprender la administración de una o más dosis que comprenden uno o más de los anticuerpos descritos en la presente memoria. El anticuerpo puede ser un anticuerpo neutralizante de CXCR3.

Un sujeto que padece T1D de aparición reciente puede conservar un nivel sérico integrado de péptido C en ayunas de al menos aproximadamente 0,03, 0,033, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 o 1,0 nmol/L x min, p. ej., aproximadamente 0,03 a 1,0 o 0,033 a 1,0 nmol/L x min durante la estimulación con péptido C. El sujeto puede tener un nivel sérico integrado de péptido C en ayunas de 0,033 a 1,0 nmol/L x min durante la estimulación con péptido C. La estimulación con péptido C puede ser una prueba de glucosa posoral y puede comprender medir los niveles séricos integrados de péptido C durante 60-150 minutos tras la administración de 10,0-13,9 mmol/L de glucosa. Véase Keymeulen et al., *Diabetologia* 53: 614-623 (2010). El aumento del nivel sérico integrado de péptido C en la prueba de tolerancia a la glucosa posoral medible del sujeto puede ser menor que 0,8, 0,7, 0,6, 0,54, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 nmol/L x min. El sujeto puede tener un aumento de 0,54 nmol/L x min, o menos, en el nivel sérico integrado de péptido C en la prueba de tolerancia a la glucosa posoral. El péptido C corresponde a los residuos 57-87 del péptido precursor de la insulina (secuencia de referencia humana NP_000198), con los residuos 90-110 y 25-54 que corresponden a las cadenas A y B de la insulina, respectivamente.

Un sujeto que padece T1D de aparición reciente puede tener un nivel de glucosa en sangre en ayunas elevado en ausencia de insulina exógena mayor que aproximadamente 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 300, 350 mg/dL (o cualquier valor intermedio), o mayor. El sujeto puede tener un nivel de glucosa en sangre en ayunas elevado, según se describió anteriormente, así como un nivel sérico integrado de péptido C en ayunas reducido, según se describió anteriormente.

Según se describe en la presente memoria, un sujeto puede tratarse mediante los métodos descritos en la presente memoria poco tiempo después de recibir el diagnóstico de T1D de aparición reciente. Según se describe en la presente memoria, el sujeto puede tratarse primero mediante los métodos descritos en la presente memoria en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses posteriores al diagnóstico clínico de la T1D de aparición reciente (o en cualquier momento intermedio). Según se describe en la presente memoria, un sujeto puede tratarse primero mediante los métodos descritos en la presente memoria en los 6 meses posteriores al diagnóstico clínico de T1D de aparición reciente. Según se describe en la presente memoria, un sujeto que padece T1D puede tratarse mediante los métodos descritos en la presente memoria en cualquier momento, independientemente del tiempo transcurrido desde el diagnóstico clínico, en donde el sujeto conserva los niveles séricos residuales de péptido C de al menos aproximadamente 0,2 nmol/L.

Métodos adicionales

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender tratamientos adicionales que se pueden administrar de manera simultánea o secuencial (antes o después) con la administración de un anticuerpo anti-CXCR3 descrito en la presente memoria. Por ejemplo, según se describe en la presente memoria, se describen métodos que comprenden la etapa adicional de administrar un inmunosupresor al sujeto además de un anticuerpo anti-CXCR3. Los inmunosupresores puede incluir, pero no se limitan a, uno o más de azatioprina (Imuran), β interferón 1a, β interferón 1b, basiliximab, corticoesteroides, ciclosporina (Sandimmune), ciclofosfamida, clorambucil, daclizumab, desoxispergualina, Etanercept, acetato de glatiramer, infliximab, leflunomida, Mercaptopurina (6-MP), metotrexato, mitoxantrona, Muromonab-CD3, Micofenolato (MFM o CellCept), natalizumab, anakinra, canakinumab, rituximab, belimumab, abatacept, aldesleucina, prednisona, rapamicina, sirolimus, tacrolimus y Ustekinumab.

Según se describe en la presente memoria, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además de administrar un anticuerpo anti-CXCR3, la etapa de administrar un agente estimulante de células β al sujeto. La etapa de administrar un agente estimulante de células β puede ser simultánea o secuencial (antes o después) a la administración de un anticuerpo anti-CXCR3. Los agentes estimulantes de células β de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, una o más de células β trasplantadas (autólogas, alógenas o sinérgicas), células productoras de insulina trasplantadas (alógenas o sinérgicas), inhibidores DDP4 (secuencia de referencia de proteína humana NP_001926.2), péptidos TM4SF20 (secuencia de referencia de proteína humana NP_079071), péptidos TMEM27 (secuencia de referencia de proteína humana NP_065716), análogos de exendina 1 o GLP-1 (secuencia de referencia de proteína humana NP_002045), ligandos del receptor gp130 y EGF y los descritos en los párrafos 8-11 de la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20100130476. Un agente estimulante de células β puede administrarse junto con un inmunosupresor en los métodos descritos en la presente memoria, ya sea de manera simultánea o secuencial (antes o después). Según se describe en la presente memoria, un agente estimulante de células β , una célula productora de insulina y/o un inmunosupresor pueden administrarse mediante la implantación de un dispositivo capaz de suministrar el agente estimulante de células β , célula productora de insulina e/o inmunosupresor al tejido u órgano diana.

También se describen en la presente memoria métodos para detectar y/o cuantificar CXCR3 y/o células que expresan CXCR3 (p. ej., linfocitos T CXCR3+). Los métodos pueden comprender usar uno o más de los anticuerpos anti-CXCR3 descritos en la presente memoria para detectar y/o cuantificar CXCR3 y/o células que expresan CXCR3. Por ejemplo, uno o más anticuerpos se pueden agregar a una muestra de paciente (p. ej., una muestra de sangre) y detectarse usando una etiqueta detectable, tal como un anticuerpo secundario conjugado a una señal detectable (p. ej., un anticuerpo de detección secundario fluorescente). Por ejemplo, se puede usar selección por FACS para cuantificar el nivel de células que expresan CXCR3 en una muestra tras la unión primaria y la secundaria con el anticuerpo fluorescente.

Los métodos de diagnóstico se pueden usar para diagnosticar un trastorno de CXCR3 o un trastorno asociado a CXCR3 (p. ej., diabetes, T1D). Por ejemplo, se puede diagnosticar un trastorno al detectar la presencia o ausencia de CXCR3 en una muestra de paciente, o al comparar la concentración de CXCR3 en una muestra con el nivel en uno o más estándares de referencia, en donde una desviación con respecto al nivel del estándar indica la presencia de un trastorno.

también se describen en la presente memoria kits que comprenden al menos un anticuerpo anti-CXCR3 o fragmento. Los kits son útiles para fines de investigación, diagnóstico y terapéuticos diversos. Por ejemplo, los kits se pueden usar para detectar linfocitos T CXCR3+ o para tratar la diabetes tipo I al administrar el anticuerpo anti-CXCR3 o fragmento contenido en el kit a un sujeto. Para el aislamiento y la purificación, el kit puede contener un anticuerpo o fragmento acoplado a una perla (p. ej., perlas de sefarsa). En ciertas realizaciones, el kit también comprende instrucciones para usar el anticuerpo anti-CXCR3 o fragmento para los fines de investigación, diagnóstico y/o terapéuticos deseados.

En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Además, en la presente solicitud, el uso de «o» significa «y/o» a menos que se indique lo contrario. Asimismo, el uso del término «incluye», así como otras formas, tales como «incluyen» e «incluido», no son limitantes. Cualquier intervalo descrito en la presente memoria se entenderá que incluye los valores extremos y todos los valores entre los valores extremos.

Los títulos de las secciones en la presente memoria se usan solamente a efectos de organizar y no se deben interpretar como limitantes del objeto descrito.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar, y de ningún modo limitar, la presente descripción.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Generación de inmunógeno. Se transformaron células CHO con ADN que codifica CXCR3 humano de longitud completa y el CXCR3 se expresó en la superficie celular («células r-CXCR3-CHO»). Se obtuvo la secuencia de CXCR3 usada para transformar las células y el marco de lectura abierto de CXCR3 se colocó en un vector de expresión pcDNA3.1neo_DEST y después se transfectó en células 300-19 (Immunogen). Un fragmento del péptido del extremo N del dominio extracelular de CXCR3 (dominio EC), con la secuencia de aminoácidos, MVLEVSDHQVLNDAEVAALLENFSSSYDYGENSESDSC, se conjugó con KLH mediante la cisteína del extremo C y se usó como un inmunógeno. Las células que expresaban CXCR3 se mantuvieron a 37 °C en CO2 al 5 % en RPMI (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) complementado con suero bovino fetal dializado al 10 % (FBS) (Invitrogen). Las células se prepararon para inyección al sustituir el medio de cultivo indicado anteriormente por disolución salina (CMF-PBS) tamponada con fosfato (sin Ca/Mg) complementada con 5 mM de EDTA y las células se recogieron en dicho tampón. Las células recogidas se granularon mediante centrifugación a 500xg durante aproximadamente 5 minutos, se lavaron una vez al resuspender el gránulo en CMF-PBS y se centrifugaron como antes, se contaron y se

ajustaron hasta el volumen adecuado (tal como 5×10^6 células en 0,2 ml) para inyección al resuspender el gránulo celular en CMF-PBS.

Preparación del anticuerpo. Se usaron los 37 aminoácidos del extremo N de CXCR3 humano para generar hibridomas monoclonales de ratón para anti-CXCR3 humano, y se seleccionaron cinco clones de anticuerpo (4, 12, 53, 82 y 135) para caracterización adicional. El extremo N de 37 aminoácidos de CXCR3 humano es 65 % homólogo a la región alineada en CXCR3 de ratón y contiene residuos importantes para la unión a CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Se inmunizaron ratones BALB/c de aproximadamente 6-8 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) con las células que expresaban CXCR3 o un péptido extracelular de CXCR3. Un grupo de ratones se cebó subcutáneamente (SC) el día 0 con una emulsión 1:1 de péptido conjugado con KLH mezclado con adyuvante (TiterMax Gold, Sigma Aldrich, n.º T2685-1ML), se reforzó SC 3-5 veces en intervalos de 2-3 semanas con una emulsión 1:1 de péptido en adyuvante o intraperitoneal (IP) con células en PBS sin adyuvante, y se reforzó dos días consecutivos antes del sacrificio por vía IP con péptido y/o células en PBS todos sin adyuvante. Otro grupo de ratones se cebó IP 3-5 veces en intervalos de 2-3 semanas y se reforzó por vía IP con células en PBS dos días consecutivos antes del sacrificio. Para ambos grupos de ratones, cada inyección contenía aproximadamente 2×10^6 células en un volumen de aproximadamente 100 μ l.

El día después de la última inyección, los ratones se sacrificaron y se retiró el bazo y se colocó en aproximadamente 10 ml de DMEM sin suero (Gibco) en una placa de Petri. Se fusionaron células de mieloma de ratón Sp2/O (ATCC CRL-1581) con células de bazo del ratón inmunizado usando PEG al 50 % (p/p) según el método de Kohler and Milstein (Nature, 256:495-7, (1975)). Al finalizar el procedimiento, las células se resuspendieron en 50ml de medio ClonaCell-Hy Hybridoma Recovery (StemCell Technologies), se transfirieron a un matraz T75cm² y se incubaron durante 16-24 horas a 37 °C. Tras esta incubación, las células se recogieron y se agregaron a 100ml de medio de selección de metilcelulosa ClonaCell-HY (StemCell Technologies). A continuación, esta mezcla se dividió en alícuotas en diez placas de cultivo tisular de 100 mm² y se incubaron durante 10-14 días. Los hibridomas clonales se transfirieron desde la metilcelulosa a medio líquido y se cultivaron en placas de 96 pocillos múltiples para ensayos para identificar los anticuerpos monoclonales específicos para CXCR3.

A menos que se indique lo contrario, la referencia en estos ejemplos a una variante de anticuerpo, tal como Hu4.1, se refiere a un anticuerpo que contienen una variante de cadena pesada y una variante de cadena ligera del mismo número (p. ej., Hu4.1 contendría la cadena pesada 4.1 y la cadena ligera 4.1). Todas las referencias a anticuerpos corresponden a la numeración de anticuerpos y el apareamiento de cadenas VH/VK que se muestra en la Tabla 2.

Animales. Los ratones NOD/LtJ hembra se adquirieron a Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos. Los ratones se sometieron a selección por glucosuria usando un medidor de glucosa en sangre plus compacto ACCU-CHEK® (Roche, Indianápolis, IN) mediante punción de la vena de la cola dos veces a la semana comenzando a las 10 semanas de edad. Se consideró que los ratones eran diabéticos cuando la glucosa en sangre medida estaba por encima de 250 mg/dL durante tres días consecutivos. Se observó a los ratones durante un mínimo de 100 días antes del inicio del tratamiento. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el IACUC interno.

Inyecciones de anticuerpo. Para los estudios de prevención, se inyectó a ratones NOD prediabéticos 100 μ g de anticuerpo intraperitonealmente (i.p.) una vez a la semana durante 6 semanas comenzando a las 10 semanas de edad. Para los estudios de reversión, los animales se incorporaron de manera aleatoria en grupos de tratamiento 1 semana después de que se consideró que los ratones eran diabéticos, la glucosa en sangre se midió dos veces al día, con al menos seis horas entre lecturas y se administró insulina mediante inyección i.p. a aquellos ratones con una glucosa en sangre por encima de 250 mg/dL a lo largo de todo el estudio. Se consideró que los ratones en los grupos de tratamiento que se mantuvieron independientes de insulina durante 30 días consecutivos sufrieron una reversión. Se extrajeron cinco ratones de cada grupo entre el quinto y sexto tratamiento y se les extrajeron los órganos linfoides, la sangre, la médula ósea y el páncreas para análisis celular. Al finalizar el estudio, se extrajo el páncreas y se procesó para análisis histológico e inmunohistoquímico. El anticuerpo anti-CXCR3 de ratón, el clon CXCR3-173 (Uppaluri *et al.* 2008) y el anticuerpo testigo de IgG de hámster se adquirieron a BioLegend (San Diego, CA).

Análisis FACS. Se prepararon suspensiones de célula simple del bazo, ganglios linfáticos inguinales, ganglios linfáticos pancreáticos y médula ósea. El páncreas se cortó en pequeños pedazos y se incubó en 2 mg/ml de colagenasa D (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) durante 30 minutos a 37 °C, se filtró a través de un tamiz de células de 70 micrones (BD Biosciences, San Jose, CA) y los linfocitos se separaron del tejido pancreático usando centrifugación con gradiente de densidad. Las células se tiñeron con anti-CD25 de ratón etiquetado con APC, anti-CD4 de ratón etiquetado con FITC y anti-Foxp3 de ratón etiquetado con PE (eBiosciences, San Diego, CA) para los linfocitos T reguladores (T reg), anti-CD8 α de ratón etiquetado con PerCP, anti-CD44 de ratón etiquetado con PE, anti-CD62L de ratón etiquetado con APC y anti-CXCR3 de ratón etiquetado con PeCy7 para linfocitos T activados/de memoria, y anti-CD94 de ratón etiquetado con FITC, anti-CD4 de ratón etiquetado con PerCP, anti-B220 de ratón etiquetado con APC, anti-CD11c de ratón etiquetado con PeCy7, anti-CD11b de ratón etiquetado con azul pacífico y anti-NKp46 de ratón etiquetado con PE para los linfocitos B, células mieloides, células dendríticas, células NK y células NKT. Las células se incubaron durante 30 min a 4 °C después del bloqueo con anti-CD16/32 de ratón durante 20 min sobre hielo. Para la mancha de T reg, se llevó a cabo tinción superficial, las células se lavaron, se

fijaron y permeabilizaron en tampón Cytofix/Perm (eBiosciences), después se tiñeron con el anticuerpo anti-Foxp3 de ratón durante 30 min sobre hielo. Después de la tinción, las células se lavaron dos veces, se fijaron en paraformaldehído y se adquirieron en el citómetro LSRII y los datos se analizaron usando el programa informático Flow Jo (Treestar, Ashland, OR). Todos los anticuerpos se adquirieron a BD Biosciences a menos que se indique lo contrario.

Ensayo de quimiotaxia. El ensayo de quimiotaxia se llevó a cabo en placas de 24 pocillos (Costar) con soportes permeables transwell con una membrana de 5µm. Las células 300.19 transfectadas con CXCR3 se colocaron en los insertos transwell a 1×10^6 células en suero bovino fetal inactivado por calor al 2,5 % en RPM1640 (volumen total 0,2 ml). Se colocaron los medios solos o complementados con quimiocina recombinante 300 ng/ml de CXCL9 (MIG), 100 ng/ml de CXCL10 (IP-10) o de 100 ng/ml CXCL11 (I-TAC) en el compartimento inferior (0,6 mls) y los insertos transwell que contenían las células se cargaron sobre los compartimentos inferiores. Las placas se incubaron entre 4-5 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C. Tras el período de incubación, se retiraron los insertos transwell y los medios totales en el compartimento inferior se concentraron y las células se granularon mediante centrifugación durante 5 min a 1200 RPM. Los medios se aspiraron y las células se tiñeron con Calceína AM (10 µg/ml final) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se granularon y lavaron, se agregaron medios (0,1 ml) y la suspensión se transfirió a placas de fondo transparente y paredes negras de 96 pocillos. Las placas se sometieron a impulsos a 1200 RPM para sedimentar las células y la fluorescencia se midió a 490/520 nm en una Flexstation. Todas las condiciones se sometieron a prueba por triplicado. Los datos resultantes se expresan como unidades de fluorescencia relativa media (UFR) de las células que migraron. Véanse las Figuras 14A-C y las Figuras 15A-C.

Para la quimiotaxia con bloqueo de CXCR3, las células 300.19 transfectadas con CXCR3 se pretrataron con diversas cantidades de anticuerpo de bloqueo o IgG testigo durante 20-30 minutos a 37 °C antes de usarse en el ensayo de quimiotaxia. El anticuerpo no se extrajo por lavado, sino que estuvo presente durante la incubación del ensayo.

Ensayo de movilización de calcio usando FLIPR. Se recuperan células de riñón embrionario humano 293 (HEK, por sus siglas en inglés) que expresaban hCXCR3 a 80 % de confluencia mediante tratamiento con PBS + 2mM de EDTA. Las células se suspendieron en medios HEK-SFM sin suero a una densidad de 1×10^6 células/mL. Se dispensaron 15 µL (15 000 células) en cada pocillo de una placa de 384 pocillos. Las células se cargaron con tinte durante 30 minutos a temperatura ambiente al agregar 15 µL de tinte 4 de calcio FLIPR reconstituido. Los clones del anticuerpo anti-CXCR3 humano y los testigos de isotipo se diluyeron en serie (3 veces) en HBSS + 20 mM HEPES + BSA al 1 % para generar 10 concentraciones de prueba por clon. Cada concentración de prueba se sometió a prueba por duplicado ($n = 2$) en la misma placa. Se agregaron 15 µL de la concentración de prueba a las células en cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó una concentración fija de CXCL11 (R & D Systems) que representaba CE80 para desencadenar la movilización de calcio intracelular sobre el FLIPR en cada pocillo y el cambio en la fluorescencia se monitorizó a lo largo del tiempo. La respuesta máxima de cada pocillo se normalizó con respecto al valor de referencia y los datos se ajustaron después de promediar en una ecuación de cuatro parámetros usando GraphPad Prism y se determinó la CI50 para cada clon. Véanse la Figura 14D y la Figura 21.

Análisis Biacore de afinidad. *Preparación de superficie Biacore.* Las afinidades de unión de los clones de anticuerpo de hibridoma α-CXCR3 humano de ratón 4, 12, 53, 82 y 135 por el péptido CXCR3 humano se calcularon usando un ensayo de cinética/afinidad Biacore T100. Un chip sensor Biacore CM5 serie S (GE n.º BR-1006-68) se inmovilizó con anticuerpo de captura anti-Fc murino de conejo (RAM-Fc) (GE n.º BR-1008-38) usando el programa de acoplamiento de amina estándar. La superficie de carboximetil dextrano del chip se activó usando una mezcla 1:1 de 0,1M N-hidroxisuccinimida (NHS) y 0,4M clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), que permitió que la superficie uniera grupos amina reactivos al anticuerpo de captura. Tras la inmovilización del anticuerpo, la superficie del chip sensor reactivo se aplacó usando 1M clorhidrato de etanolamina/NaOH pH 8,5. La inmovilización resultó en 8000 UR del anticuerpo de captura RAM-Fc en una celda de flujo. Otra celda de flujo vacía se usó como superficie para la resta de referencia durante el análisis de datos.

Condiciones del ensayo Biacore. Las temperaturas de la cámara de muestra del instrumento Biacore T100 y del ensayo se fijaron en 4 °C y 25 °C, respectivamente. Los anticuerpos anti-hCXCR3 de ratón se diluyeron hasta 500nM en tampón de pasada HBS-EP+ (10mM HEPES, 150mM NaCl, 0,05% tensioactivo P20, 3mM EDTA, pH 7,4) y se capturaron usando una inyección de treinta segundos a 10µl/min. Estas condiciones resultaron en ~1200 UR de captura estable de cada clon anti-hCXCR3 de ratón evaluado. Los péptidos hCXCR3 se diluyeron hasta concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12,5 y 0nM en HBS-EP+. En cada ciclo de ensayo, se inyectó el péptido durante cinco minutos a una velocidad de flujo de 50µl/min para medir la asociación, después se lavó en HBS-EP+ durante diez minutos a una velocidad de flujo de 50µl/min para medir la disociación. La superficie de captura (RAM-Fc) se regeneró entre ciclos de ensayo usando 10mM de glicina-HCl pH 1,7 a 50µl/min durante tres minutos. El análisis se llevó a cabo en el programa informático Biacore T100 Kinetics Evaluation v2.0 (GE Healthcare). Los sensogramas se adaptan a un modelo de unión 1:1 con celda de flujo de referencia y resta de concentración 0nM (resta de doble referencia).

Ensayo de receptor entero Biacore. La proteína del receptor CXCR3 humano de longitud completa con 6xHis en el extremo C y etiqueta de HPC4 se expresó en células Sf9 de insecto con un vector de baculovirus. A continuación, la

proteína del receptor se purificó a través de purificaciones de afinidad con Ni-NTA y HPC4. Se intercambió el tampón del producto final a 10 mM HEPES, 300 mM NaCl, n-Dodecil β -D-Maltopiranósido al 0,5 % y glicerol al 5 %. La proteína del receptor se capturó en chips NTA a través de quelante Ni y se estabilizó adicionalmente mediante acoplamiento a amina usando una mezcla diluido 1:10 de la mezcla 1:1 de 0,1M N-hidroxisuccinimida (NHS) y 0,4M clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). La superficie del receptor estabilizada se sometió a ensayo para determinar la actividad de unión al ligando al inyectar 20 nM de los ligandos hCXCL10 y hCXCL11. Para el análisis de cinética, los ligandos de CXCR3 humano (hCXCL9, hCXCL10 y hCXCL11) se diluyeron hasta concentraciones de 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6125, 0,3125 y 0nM en HBS-EP+. Los anticuerpos anti-CXCR3 se diluyeron hasta concentraciones de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 y 0nM en HBS-EP+. El analito se inyectó durante cinco minutos a una velocidad de flujo de 50 μ l/min para medir la asociación y después se lavó en HBS-EP+ durante diez minutos a una velocidad de flujo de 50 μ l/min para medir la disociación. La superficie del receptor se regeneró entre ciclos de ensayo usando 10mM de glicina-HCl pH 1,7 a 50 μ l/min durante 1 minuto. El análisis se llevó a cabo en el programa informático Biacore T100 Kinetics Evaluation v2.0 (GE Healthcare). Los sensogramas se adaptan a un modelo de unión 1:1 con celda de flujo de referencia y resta de concentración 0nM (resta de doble referencia).

Prueba de tolerancia a la glucosa. La tarde antes de la exposición a glucosa, se monitorizó la glucosa en sangre sin ayuno y se omitió el tratamiento con insulina a los animales diabéticos. Los ratones se sometieron a ayuno durante 12 horas antes de la inyección i.p. de D-glucosa (20 %; Sigma) a 2 mg/g de peso corporal. La glucosa en sangre se midió antes y 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección.

Ejemplo 2: Caracterización de los ratones NOD

Se tiñeron secciones representativas del páncreas de ratones NOD hembra prediabéticos y ratones NOD hembra con diabetes de aparición reciente de 6 a 10 semanas embebidas en parafina para insulina, CXCL10 y el marcador de linfocitos T CD3. Figura 1. Se detectó la expresión de CXCL10 en el páncreas de ratones NOD dentro de islotes rodeados por células infiltradas (flechas en la columna central de la Figura 1). Los ratones prediabéticos y con diabetes de aparición reciente de mayor edad exhibieron un aumento marcado en la infiltración de linfocitos T en los islotes (Figura 1, columna derecha) y una disminución en la producción de insulina dentro de los islotes (Figura 1, columna izquierda).

Para evaluar adicionalmente sin los linfocitos T CXCR3+ estaban presentes en el páncreas de ratones NOD, se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo en el tejido del páncreas extraído de ratones NOD hembra con diabetes de aparición reciente. Figura 2. La expresión de CXCR3 se evaluó en linfocitos T CD4+/TCR+ y CD8+/TCR+. La tinción con anticuerpo testigo de isotipo se representa mediante la curva sombreada. La citometría de flujo se llevó a cabo en suspensiones de célula simple de tejido de páncreas concentrado extraído de diversos ratones. Los datos indican que los linfocitos T cooperadores y citotóxicos CXCR3+ estaban presentes en el páncreas de ratones NOD.

Ejemplo 3: Tratamiento profiláctico de ratones NOD con anticuerpo anti-CXCR3

Los ratones NOD hembra prediabéticos se trataron una vez a la semana durante seis semanas con 100 μ g de un anticuerpo anti-CXCR3 murino de hámster (clon CXCR3-173, adquirido a BioLegend, San Diego, CA), o con una IgG de hámster testigo o PBS, comenzando a las 10 semanas de edad. La glucosa en sangre se monitorizó dos veces a la semana y se consideró que un animal era diabético y se sacrificó después de exhibir tres lecturas de glucosa en sangre consecutivas por encima de 250 mg/dL. La Figura 3 muestra el porcentaje de ratones que desarrollaron diabetes a lo largo del tiempo para cada grupo de tratamiento. Cada línea representa los resultados combinados de diez ratones por grupo. Se muestran los resultados de dos estudios independientes (Figuras 3A y 3B). Los gráficos ilustran que el tratamiento profiláctico con un anticuerpo anti-CXCR3 previno el desarrollo de diabetes en ratones NOD hembra prediabéticos.

Para evaluar adicionalmente los efectos de la administración profiláctica del anticuerpo anti-CXCR3, se tiñeron secciones de páncreas representativas de los ratones NOD hembra tratados con el anticuerpo anti-CXCR3 para insulina (Figura 4, panel izquierdo), CD3 y Foxp3 (Figura 4, paneles central y derecho). El panel derecho en la Figura 4 es una imagen ampliada de la sección que se muestra en el panel central. El tejido del páncreas se extrajo de los ratones al final del período del estudio (26 semanas de edad). La Figura 4 demuestra que islotes positivos para insulina estaban presentes en ratones NOD tratados con un anticuerpo anti-CXCR3, mientras que la mayoría de los linfocitos T rodeaban y no habían invadido los islotes.

Ejemplo 4: Reversión de la diabetes de aparición reciente en ratones NOD

Los ratones hembra con tres lecturas de glucosa en sangre consecutivas por encima de 250 mg/dL se consideraron diabéticos y se incorporaron aleatoriamente a grupos de tratamiento. El tratamiento se inició una semana después de la incorporación. Los ratones se trataron con PBS, anticuerpo anti-CXCR3 de ratón (100 μ g administrados intraperitonealmente, clon CXCR3-173) o IgG testigo (100 μ g administrados i.p.) una vez a la semana durante seis semanas o globulina antitimocítica murina (mATG; 500 μ g administrados i.p.) en los días 0 y 4. Tras la incorporación, la glucosa en sangre se midió en la mañana y en la tarde (con al menos seis horas entre una y otra), y se administró insulina mediante inyección i.p. solo a los ratones cuya glucosa en sangre estaba por encima de 250 mg/dL. Se muestran los valores de glucosa en sangre en la mañana diarios para los ratones individuales (Figura 5). Los datos

se agruparon a partir de cuatro estudios de reversión independientes con 8-10 ratones por grupo por estudio. Los datos demuestran la reversión de la diabetes de aparición reciente en ratones NOD después del tratamiento con el anticuerpo anti-CXCR3.

Para evaluar los cambios en los subconjuntos de linfocitos T en el páncreas de ratones tratados con el anticuerpo anti-CXCR3, se agruparon suspensiones de célula simple del páncreas de cuatro ratones por grupo de tratamiento (ratones tratados con PBS, anti-CXCR3 de ratón, IgG testigo o mATG), se tiñeron para linfocitos T y se analizaron mediante citometría de flujo. El tejido del páncreas se extrajo unos pocos días después de la quinta dosis de tratamiento con PBS, anti-CXCR3 de ratón o IgG testigo, y de ratones tratados con mATG de la misma edad. El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en las suspensiones se muestra en la Figura 6A. La Figura 6B muestra la expresión de CD44 y CD62L en linfocitos T CD4⁺ en el páncreas de ratones tratados con PBS (izquierda), IgG testigo (medio) y anticuerpo anti-CXCR3 de ratón (derecha). El porcentaje de células en la ventana de adquisición 1 (G1; CD44^{hi}CD62L^{lo}) se indica para cada grupo de tratamiento (67,3 % para PBS, 67,1 % para IgG testigo y 30,4 % para el tratamiento con anti-CXCR3). La Figura 6C es un gráfico de la expresión de CXCR3 en linfocitos T CD4⁺ en la ventana de adquisición 1 (G1) y la ventana de adquisición 2 (G2), según se definen en la Figura 6B, en comparación con las células teñidas con el anticuerpo testigo de isotipo y adquiridas en linfocitos.

Para evaluar si los islotes positivos para insulina están presentes en ratones NOD con reversión por el tratamiento con anti-CXCR3, se prepararon secciones de páncreas embebidas en parafina a partir de ratones NOD hembra tratados con IgG testigo (paneles izquierdos), anticuerpo anti-CXCR3 de ratón (paneles centrales) y ATG murina (paneles derechos) y se tiñeron para determinar la insulina (hilera superior) o se cotiñeron para determinar CD3 y Foxp3 (hilera inferior). Véase la Figura 7. El tejido del páncreas se extrajo de los ratones al final del estudio (aproximadamente 100 días después de la incorporación). Las secciones teñidas demostraron que estaban presentes islotes positivos para insulina en ratones NOD con reversión por tratamiento con anti-CXCR3, y que había linfocitos T rodeando los islotes, pero pocos habían invadido los islotes.

Para evaluar la respuesta a la exposición a glucosa, se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa. Figura 8. Se sometió a ayuno durante toda la noche a ratones NOD hembra no diabéticos (Figura 8A), ratones NOD diabéticos que se habían tratado con PBS (Figura 8B), ratones NOD diabéticos con reversión por tratamiento con anti-CXCR3 de ratón (Figura 8C) y ratones NOD diabéticos que se habían tratado con IgG (Figura 8D) de la misma edad y se expusieron a glucosa mediante inyección i.p. La glucosa en sangre se midió antes (tiempo 0) y después de la exposición en los tiempos indicados. Se muestran los datos representativos de 4-5 ratones por grupo de tratamiento. Los datos ilustran que el tratamiento con el anticuerpo anti-CXCR3 mejoró la tolerancia a la glucosa en ayunas 100 días después de la incorporación en el estudio.

Ejemplo 5: Transferencia adoptiva de linfocitos T

Para evaluar la capacidad de los linfocitos T de ratones NOD tratados con anticuerpo anti-CXCR3 (clon CXCR3-173) y que exhiben remisión de la enfermedad para inducir diabetes en animales receptores, se transfirieron adoptivamente linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ aislados a ratones NOD.scid receptores (diabéticos no obesos - con inmunodeficiencia combinada grave) mediante inyección intravenosa. La Figura 9 muestra el porcentaje de ratones no diabéticos a lo largo del tiempo después de la transferencia adoptiva de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ aislados de ratones diabéticos tratados con PBS o IgG testigo, o ratones en remisión de la enfermedad después del tratamiento con ATG murina o anticuerpo anti-CXCR3 de ratón. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se aislaron a partir del bazo, ganglios linfáticos pancreáticos y ganglios linfáticos inguinales extraídos 80-90 días después de la incorporación en el estudio de ratones NOD hembra en los diferentes grupos de tratamiento. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se concentraron y se transfirió adoptivamente un total de 8 millones de células a receptores NOD.Scid y el desarrollo de la diabetes se monitorizó mediante mediciones de glucosa en sangre bisemanales. Cada línea en la Figura 9 representa los datos combinados de cinco ratones por grupo. Se muestran dos estudios representativos (Figuras 9A y 9B). Los linfocitos T aislados de ratones tratados con anticuerpo anti-CXCR3 exhiben un retardo en la transferencia de la enfermedad.

Los linfocitos T donantes aislados se caracterizaron adicionalmente. La Figura 10A muestra el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ totales (panel izquierdo) en los linfocitos T donantes aislados a partir de ratones tratados con PBS, anticuerpo anti-CXCR3 de ratón, IgG testigo o ATG murina según se describió en el párrafo anterior. Los paneles derechos de la Figura 10A muestran el porcentaje de linfocitos T efectoros y de memoria central en el subconjunto de linfocitos T que eran CD4⁺ (panel superior) y CD8⁺ (panel inferior) para cada suspensión de células donantes, según se define por la expresión de CD44 y CD62L. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ concentrados aislados se tiñeron para determinar la expresión de CD44 y CD62L antes de la transferencia, se adquirieron en un citómetro de flujo y se analizaron. También se evaluó el porcentaje de linfocitos T reguladores en las concentraciones de linfocitos T donantes aislados. La Figura 10B muestra el porcentaje de linfocitos T reguladores para cada grupo de tratamiento, según se definen por la expresión de CD4 y CD25 o por la expresión de CD4, CD25 y Foxp3 intracelular. La Figura 10C muestra el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ (panel izquierdo) y CD4⁺ (panel derecho) en las células donantes que también expresan CXCR3. Los datos demuestran que hubo un porcentaje reducido de linfocitos T CXCR3⁺ en células donantes de ratones con reversión por tratamiento con el anticuerpo anti-CXCR3.

La eficacia del tratamiento con CXCR3 tras la transferencia adoptiva de linfocitos T donantes OT-1 CD8+ se evaluó usando el modelo RIP-OVA de diabetes tipo 1. Los ratones RIP-OVA son ratones transgénicos en los que se ha introducido un transgén que codifica proteína ovoalbúmina (OVA) impulsado por el promotor de insulina de rata (RIP, por sus siglas en inglés) en el genoma de ratón y resulta en la expresión de una forma membranaria de ovoalbúmina en las células β de islote. La cepa original de los ratones es C57BL/6 y los ratones RIP-OVA no desarrollan diabetes de manera espontánea. Los ratones RIP-OVA, también denominados C57BL/6-Tg(Ins2-TFRC/OVA)296Wehi/WehiJ, se adquirieron al Jackson Laboratory. La diabetes se desarrolla en estos ratones después de la transferencia adoptiva de linfocitos T CD8+ específicos para ovoalbúmina de ratones transgénicos OT-1 TCR (receptor de linfocito T) (Kurts et al. J Exp Med 184: 923-930) adquiridos al Jackson Laboratory. Los ratones OT-1 contienen insertos transgénicos para los genes TCRA-V2 y TCRB-V5 de ratón (Hogquist et al. Cell 76:17-27). El TCR transgénico reconoce los residuos de ovoalbúmina en el contexto de las proteínas MHC I H2K^b. Más del 95 % de los linfocitos T CD8+ en los ratones OT-1 expresa el TCR transgénico y reconoce y se activa mediante el péptido de ovoalbúmina.

La Figura 11 muestra el porcentaje de ratones no diabéticos a lo largo del tiempo tras la transferencia adoptiva de linfocitos T OT-1 CD8+ a ratones receptores RIP-OVA que se dejaron sin tratamiento, se trataron con anticuerpo anti-CXCR3 o se trataron con IgG testigo. El tratamiento (100 μ g i.p.) se inició 1 día (estudio 1 y estudio 2) o 7 días (estudio 2) después de la transferencia adoptiva y se administró dos veces a la semana durante 3 semanas. Cada línea representa los datos combinados de cinco ratones por grupo. Los resultados de dos estudios se muestran en las Figuras 11A y 11B. Los datos demuestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CXCR3 protegió a los ratones contra el desarrollo de diabetes en el modelo RIP-OVA.

La Figura 12 proporciona datos adicionales que caracterizan la eficacia de diferentes tratamientos tras la transferencia adoptiva de linfocitos T OT-1 a ratones receptores RIP-OVA. La Figura 12A muestra la expresión de CXCR3 en linfocitos T donantes analizada mediante citometría de flujo antes de la transferencia adoptiva a los ratones receptores RIP-OVA. La tinción con anticuerpo testigo de isotipo se representa mediante la curva sombreada. La Figura 12B muestra el porcentaje de células donantes en la sangre, bazo y ganglios linfáticos pancreáticos (pLN, por sus siglas en inglés) en los tiempos indicados tras la transferencia adoptiva de linfocitos T OT-1 a ratones receptores RIP-OVA tratados con anticuerpo anti-CXCR3 de ratón o IgG testigo. El tratamiento con anticuerpo (100 μ g i.p.) se inició un día después de la transferencia de los linfocitos T y se suministró dos veces a la semana durante dos semanas. Cada punto representa los datos de un ratón individual. La Figura 12C indica la cantidad de células donantes en la sangre, bazo y ganglios linfáticos pancreáticos (pLN) que proliferaron en respuesta a la estimulación del autoantígeno (OVA) en los ratones receptores RIP-OVA tratados con anticuerpo anti-CXCR3 de ratón o IgG testigo en los tiempos indicados tras la transferencia adoptiva. El tratamiento con anticuerpo (100 μ g i.p.) se inició un día después de la transferencia de los linfocitos T OT-1 y se suministró dos veces a la semana durante dos semanas. Cada punto representa los datos de un ratón individual. La Figura 12D muestra el porcentaje de células donantes que expresan CXCR3 en la sangre, bazo y ganglios linfáticos pancreáticos (pLN) en los tiempos indicados tras la transferencia adoptiva de linfocitos T OT-1 a ratones receptores RIP-OVA tratados con anticuerpo anti-CXCR3 de ratón o IgG testigo. El tratamiento con anticuerpo (100 μ g i.p.) se inició un día después de la transferencia de los linfocitos T OT-1 y se suministró dos veces a la semana durante dos semanas. Cada punto representa los datos de un ratón individual. El tratamiento con anticuerpo anti-CXCR3 condujo a un porcentaje reducido de linfocitos T CXCR3+ en los ratones RIP-OVA.

La Figura 13 muestra secciones de páncreas embebidas en parafina representativas de ratones receptores RIP-OVA que se dejaron sin tratamiento y teñidas para determinar la insulina (Figura 13A) o CD3 (Figura 13B), o tratados con anticuerpo anti-CXCR3 de ratón y teñidas para determinar la insulina (Figura 13C) o CD3 (Figura 13D). El tratamiento con anticuerpo anti-CXCR3 (100 μ g i.p.) se inició un día después de la transferencia de los linfocitos T OT-1 y se suministró dos veces a la semana durante 3 semanas. El tejido del páncreas se extrajo al final del estudio (aproximadamente 60 días después de la transferencia de los linfocitos T). Las secciones muestran una ausencia de infiltración de linfocitos T en los ratones RIP-OVA tratados con el anticuerpo anti-CXCR3 de ratón.

Ejemplo 6: Evaluación de clones de anticuerpo anti-CXCR3 humano

Los clones del anticuerpo anti-CXCR3 humano Cl 4, 12, 53, 82 y 135 se evaluaron para determinar su efecto sobre la quimiotaxia de CXCR3 y la movilización de calcio, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente en la sección Materiales y métodos (Ejemplo 1). Para el ensayo de quimiotaxia, se preincubaron células 300.19 transfectadas con CXCR3 humano en medio solo o con diversas concentraciones de anticuerpo, según se indica en las Figuras 14A-C, antes de agregarlas al ensayo de quimiotaxia. Las Figuras 14A-C muestran que la quimiotaxia mediada por CXCR3 a CXCL11 se inhibe mediante los clones Cl 4, 12, 53, 82 y 135. El clon 2 en la Figura 14 es idéntico al clon 4.

Para el ensayo de flujo de calcio, se incubaron células HEK transfectadas con CXCR3 humano en diversas concentraciones de anticuerpo antes de agregarlas a FLIPR según los métodos descritos anteriormente en la sección Materiales y métodos (Ejemplo 1). La concentración del anticuerpo necesaria para inhibir la movilización de calcio un 50 % para cada anticuerpo se muestra en la Figura 14D. La Figura 14D muestra que la movilización de calcio mediada por CXCR3 a CXCL11 se inhibe mediante los clones Cl 4, 12, 53 y 135.

Para analizar adicionalmente el efecto de los clones 4, 12, 53, 82 y 135 sobre la quimiotaxia, se preincubaron células 300.19 transfectadas con hCXCR3 en medio solo o con 50 µg/ml de anticuerpo antes de agregarlas al ensayo de quimiotaxia y se evaluó la migración a CXCL9 (Figura 15A), CXCL10 (Figura 15B) y CXCL11 (Figura 15C). Los datos demuestran que los clones 4, 12, 53, 82 y 135 inhiben la migración a CXCL10 y CXCL11 y parcialmente inhiben la migración a CXCL9.

Para evaluar la especificidad de los clones 4, 12, 53, 82 y 135, los anticuerpos se sometieron a ensayo para determinar la unión a otros receptores de quimiocina. Se transfectaron células 300.19 con CXCR1, CXCR5, CXCR2, CXCR4 o CCR5 humanos y la unión al anticuerpo se analizó mediante incubación con los clones de anticuerpo anti-CXCR3 humano y posteriormente tinción con anticuerpo secundario y citometría de flujo. La administración del anticuerpo secundario solo sirvió como testigo negativo. Las células 300.19 transfectadas con CXCR3 humano sirvieron como testigo positivo para la tinción mediante los clones. La Figura 16 muestra histogramas de unión de anticuerpo a células que expresan los diferentes receptores de quimiocina, lo que demuestra que los clones 4, 12, 53, 82 y 135 no se unen a los otros receptores de quimiocina y son específicos para CXCR3.

Se emplearon procedimientos de citometría de flujo estándares en el ensayo de unión a receptor de quimiocina. De manera resumida, las líneas celulares se recogieron mediante tratamiento de Versene y cada línea celular se dividió en siete muestras. Cada muestra se incubó sobre hielo con un anticuerpo primario (5 µg/ml) y posteriormente se tiñó con un anticuerpo secundario conjugado con FITC para detectar el anticuerpo primario unido. Como testigo negativo, las células se tiñeron con el anticuerpo secundario solo (sin incubación con el anticuerpo primario). El anticuerpo primario fue un clon de anticuerpo anti-CXCR3 humano o el clon del anticuerpo testigo anti-CXCR3 humano 1C6. Después de la tinción, las células se adquirieron en un citómetro de flujo y los datos se analizaron usando el programa informático FlowJo. Cada línea en la Figura 16 representa una muestra individual de células teñidas con un anticuerpo primario y el anticuerpo secundario o con el anticuerpo secundario solo.

La afinidad (K_a) y la disociación (K_d) para los clones 4, 12, 53, 82 y 135 se analizaron usando un ensayo Biacore según los métodos descritos anteriormente (Ejemplo 1). Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4

Clon n.º	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
4	108539,245	0,000348	3,2076E-09
53	79557,574	0,000581	7,3085E-09
12	183854,704	0,001473	8,01056E-09
82	195114,396	0,001828	9,36793E-09
135	88939,340	0,001214	1,36548E-08

Ejemplo 7: Mapeo de epítomos

Se usaron péptidos de CXCR3 humano biotinilados (fragmentos del extremo N de 16 aminoácidos) del dominio extracelular del extremo N de CXCR3 para determinar los epítomos para los clones 4, 12, 53, 82 y 135. Se generó una serie de fragmentos sustituidos con alanina (véase la tabla 5 más adelante, la sustitución con alanina está en negrita) y se biotinilaron. El mapeo de epítomos se evaluó mediante los análisis Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA) y Biacore™ (GE Healthcare).

Para el análisis Octet, los péptidos se resuspendieron en DMSO al 80 % y se diluyeron hasta 10 µg/ml en PBS. Los clones de anticuerpo 4, 12, 53, 82, 135 y el clon comercial 1C6 (BD Biosciences) se diluyeron hasta 120 nM en PBS. El ensayo de cinética se llevó a cabo en un formato de placa de 96 pocillos con 300 µl/pocillo en un sistema Octet QK (ForteBio). Cada placa de ensayo incluyó péptido de hCXCR3 ECD natural de longitud completa (Abgent) biotinilado en el extremo N como testigo positivo, así como un pocillo en blanco con tampón PBS para la resta de referencia. Los biosensores Octet Streptavidin (ForteBio) se prerremojaron en PBS durante al menos cinco minutos antes de ejecutar el ensayo. Los biosensores primero se sumergieron en PBS durante cinco minutos sin agitación para obtener un valor inicial. Para todas las etapas restantes, la velocidad de agitación fue de 1000 rpm. Los biosensores se sumergieron en disoluciones de péptido durante cinco minutos para cargar los péptidos. Se llevó a cabo otra etapa de valor inicial en PBS durante cinco minutos. A continuación, los biosensores se sumergieron en disoluciones de anticuerpo durante diez minutos para medir la asociación. Finalmente, los biosensores se transfirieron a PBS durante quince minutos para la disociación. Los sensogramas se analizaron usando Octet Data Analysis v7.0. La

actividad de unión se expresó como un porcentaje del nivel de respuesta máximo de cada anticuerpo en comparación con el péptido de hCXCR3 de longitud completa natural.

Los niveles de respuesta relativos se registraron en un mapa de calor de epítomos. Las respuestas máximas del sensograma al péptido de hCXCR3 ECD natural variaron entre 4-8nm. Cada clon sometido a barrido tenía un único epítopo. Ninguno de los mutantes sometidos a prueba suprimió completamente la unión del clon 1C6. El residuo Valina en la posición 10 y Aspartato en la posición 13 tuvieron un papel en la unión de todos los anticuerpos sometidos a barrido. Los anticuerpos 12 y 1C6 tuvieron los epítomos más cercanos al extremo N, donde las mutaciones de Valina en la posición 5 influyeron sobre la actividad de ambos. El anticuerpo 82 tuvo el epítopo más cercano al extremo C y una reducción en la actividad de unión comenzó con la Glutamina en la posición 9. En función de estos datos, los límites de epítomos de aminoácidos en la secuencia de CXCR3 fueron los siguientes para cada anticuerpo; Cl 4: aminoácidos 7-13; Cl 12: aminoácidos 5-13; Cl 53: aminoácidos 7-13; Cl 82: aminoácidos 9-15; Cl 135: aminoácidos 7-13; y clon 1C6: aminoácidos 5-13.

Para el análisis Biacore, los péptidos se diluyeron hasta 10 ng/ml en tampón de pasada HBS-EP+ (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, Polisorbato 20 al 0,005 %). Mediante el uso de un Biacore T100™, los péptidos se inyectaron en chips CM5-SA (GE n.º BR-1005-31) a una velocidad de 5µl/min hasta que se obtuvo una captura estable de 20 unidades de respuesta (UR) por celda de flujo. La celda de flujo 1 permaneció en blanco para la resta de referencia en cada chip. El péptido de 37AA hCXCR3 natural se incluyó en una celda de flujo de cada chip como testigo positivo. Los anticuerpos anti-CXCR3 de ratón 4, 12, 53, 82 y 135 se diluyeron hasta 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125nM en HBS-EP+. En cada ciclo, los anticuerpos se inyectaron durante tres minutos a una velocidad de flujo de 50µl/min para medir la asociación, posteriormente tampón durante tres minutos a 50µl/min para medir la disociación. La superficie del péptido se regeneró entre ciclos usando 10mM de glicina-HCl pH 2,0 a 50µl/min durante sesenta segundos. Los sensogramas se ajustaron en un modelo de unión 1:1 y se analizaron usando resta de doble referencia en BiaEvaluation v2.0.1 y se capturaron sobre biosensores con estreptavidina. Los niveles de respuesta típicos variaron entre 0-500 UR, y se determinaron los cortes para respuestas de unión «Intensa», «Moderada» y «Débil». Los niveles de respuesta relativos se registraron para generar un mapa de epítomos. Las disociaciones se clasificaron y los péptidos que resultaron en valores Kd más rápidos (mayores que 0,001s⁻¹) también se registraron.

Tabla 5

Seq No.	Id	Secuencia	Seq Id No.	Secuencia
		AV LEVSDHQVLNDAEV		MVLEVSDH AV LNDAEV
		MA LEVSDHQVLNDAEV		MVLEVSDH QA LNDAEV
		MVA EVSDHQVLNDAEV		MVLEVSDHQV AN DAEV
		MVLA VSDHQVLNDAEV		MVLEVSDHQVL AD AEV
		MVLEA SDHQVLNDAEV		MVLEVSDHQVLN AA EV
		MVLEVAD HQVLNDAEV		MVLEVSDHQVLN DA EV (natural)
		MVLEVSA HQVLNDAEV		MVLEVSDHQVLN DA AV
		MVLEVSDA QVLNDAEV		MVLEVSDHQVLN DAEA

Todos los anticuerpos se unieron a hCXCR3 natural y dentro de los primeros 16AA de la secuencia de hCXCR3. Los datos de unión se muestran en la Tabla 6 para los clones 4, 12, 53, 82 y 135, y el mapa correspondiente que muestra los límites de los epítomos mínimos requeridos para la actividad de unión para cada clon de anticuerpo se muestran en la Figura 18, donde los residuos importantes se marcan con una X. Todos los epítomos de anticuerpo se mapearon dentro de los residuos 6-15 de la secuencia de CXCR3 humano, la región implicada en la unión de CXCL10 y CXCL11. Los aminoácidos dentro del epítopo se determinaron al detectar una reducción en la respuesta de unión después de una sustitución con alanina en una posición dada en el fragmento del péptido de CXCR3. Los clones 53 y 135 tuvieron los epítomos más similares. Los clones 4 y 12 tuvieron el epítopo más cercano al extremo N (la intensidad de unión se afectó comenzando con la valina en la posición cinco). El clon 82 tuvo el epítopo más cercano al extremo C, con una reducción en la actividad de unión que comenzó con la glutamina en la posición 9. El aspartato en la posición 7 en CXCR3 es necesario para cada clon excepto el 82. La valina en la posición diez y el

aspartato en la posición trece en CXCR3 tienen ambos un papel en la unión de todos los clones. No hubo diferencia en los epítomos entre las versiones murina, quimérica y humanizada de los cinco clones.

Tabla 6

Secuencia	Clones de mAb α -hCXCR3				
	4	12	53	82	135
Biotina- AV LEVSDHQVLNDAEV	+++	+++	+++	+++	+++
Biotina- MA LEVSDHQVLNDAEV	+++	+++	+++	+++	+++
Biotina-MV AE VSDHQVLNDAEV	+++	+++	+++	+++	+++
Biotina-MV LA VSDHQVLNDAEV	+++	+++	+++	+++	+++
Biotina-MVLE AS DHQVLNDAEV	+++ *	+++ *	+++	+++	+++
Biotina-MVLEV AD HQVLNDAEV	+++	+	+++	+++	+++
Biotina-MVLEV SA HQVLNDAEV	-	+	+	+++	+
Biotina-MVLEV SDA QVLNDAEV	+++ *	+	+++	+++	+++ *
Biotina-MVLEVSDH AV LNDAEV	+++	+++	+++	+++ *	+++
Biotina-MVLEVSDH QA LNDAEV	-	++*	+ *	++ *	+ *
Biotina-MVLEVSDH QV ANDAEV	+ *	+++	+++	+++	++
Biotina-MVLEVSDH QVL ADAEV	+ *	+++	+++	-	++ *
Biotina-MVLEVSDH QVLN AAEV	-	++	-	-	-
Biotina-MVLEVSDH QVLNDA EV	+++	+++	+++	+++	+++
Biotina-MVLEVSDH QVLNDA AV	+++ *	+++	+++	++ *	+++ *
Biotina-MVLEVSDH QVLNDAEA	+++	+++	+++	+++	+++

Leyenda

+++ Respuesta de unión intensa (>300 UR)

++ Respuesta de unión moderada (150-300 UR)

+ Respuesta de unión débil (10-150 UR)

- Sin unión (<10 UR)

* Disociación rápida ($K_d > 0,001$) a pesar de la respuesta de unión más intensa (>10 UR)

Ejemplo 8: Humanización de clones de anti-CXCR3 humano

Se generaron cuatro variantes (quimérica, humanizadas 1 (Hu1), Hu2 y Hu3) para cada uno de los cinco clones anti-CXCR3 (clones 4, 12, 53, 82 y 135). Los 20. Todas las variantes quiméricas se produjeron mediante «expresión concentrada» para estudios con modelo animal *in vivo*. Las células CHO-DXB11 (Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci., 77:4216-20, (1980)) que se adaptaron al cultivo en suspensión se electroporaron con vectores de expresión que contenían las cadenas pesada y ligera de los clones del anticuerpo para CXCR3 quimérico 4, 12, 53, 82 y 135. Estos vectores de expresión también contenían el gen de dihidrofolato reductasa para seleccionar los

transfectantes de CHO estables. Tras la selección con 100 nM metotrexato, las concentraciones de CHO transfectadas establemente se usaron para pasadas de bioproducción completa en matraces de agitación con medio OptiCHO. El anticuerpo quimérico recombinante se purificó a partir del medio acondicionado usando cromatografía de proteína A estándar. Los clones Hu1 recibieron injertos de CDR en las regiones de marco humanas y se humanizaron completamente, excluyendo los aminoácidos de las CDR de ratón y cualesquiera residuos en la posición de Vernier. Los clones Hu2 fueron clones con «CDR expandida», con cambios retromutados a partir de las secuencias de Hu1 en residuos posicionados a cuatro aminoácidos de las CDR de ratón. Los clones Hu3 incluían retromutaciones adicionales a partir de las secuencias de Hu2 en las posiciones identificadas como «muy distintas» entre ratones y humanos, usando el modelado basado en IMGT. Las veinte variantes totales se expresaron transitoriamente en células CHO-NRC y se purificaron para ensayos *in vitro*.

Se llevó a cabo una humanización adicional para los clones 4 y 53. Las cadenas pesadas 4.7-4.11 incluyeron retromutaciones humanizadas adicionalmente fuera de las CDR, así como modificaciones para retirar un sitio de desamidación en las posiciones 58 y 59 (numeración de IMGT) en la CDR2 de VH en un esfuerzo por mejorar la estabilidad del clon. En particular, el sitio de desamidación en VH 4.2 se reemplazó por varios residuos alternativos. Los clones VH 53.4-53.6 y VL 53.4-53.9 incluyeron retromutaciones humanizadas adicionalmente fuera de las CDR, particularmente en un esfuerzo por hacer que las cadenas fueran más similares a VH 4.1 y VL 4.1.

Ejemplo 9: Cinética de unión del receptor entero

Se evaluó la cinética de unión de las veinte variantes anti-CXCR3 usando Octet® y Biacore™ con péptidos de CXCR3 intactos. El análisis Octet se llevó a cabo según se describió anteriormente. Para el análisis Biacore, péptidos de CXCR3 naturales humanos purificados en etapa de tres columnas se etiquetaron en el extremo C con His y HPC4 se capturaron en chips NTA a través de quelado con níquel y acoplamiento con amina. Los chips de UR medias (aproximadamente 1200 UR) se usaron para una mejor calidad de los datos y para minimizar el efecto de unión bivalente. Se inyectaron 0-80nM de las muestras de anticuerpo sobre el receptor. Se llevó a cabo un análisis de evaluación de Biacore™ estándar usando gráficos de sensogramas con ajuste $R_{\text{máx}}$ local para un mejor ajuste de la curva. Se evaluaron las curvas de unión para las cuatro variantes (quimérica (Ch) y humanizadas (Hu) 1-3) para los cinco clones (4, 12, 53, 82, y 135). A efectos de comparación, también se evaluó la cinética de unión de los ligandos de CXCR3 humanos CXCL9, CXCL10, y CXCL11, y CXCL11 de ratón (mCXCL11). Los resultados se muestran más adelante en las Tablas 7A (clasificados por KD) y 7B (clasificados por Kd). Las mejores cuatro variantes por KD y Kd están resaltadas en las tablas. Cuando las variantes de mAb anti-hCXCR3 humanizadas se clasificaron por disociación (Kd), la mayoría de las variantes exhibió disociaciones al menos 1 dígito más lentas que el ligando de CXCR3 humano más potente hCXCL11.

Tabla 7A

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
4Hu2	1,59E+05	8,18E-05	5,15E-10
4Ch	2,09E+05	1,15E-04	5,48E-10
4Hu3	1,54E+05	8,62E-05	5,60E-10
4Hu1(UR baja)	2,24E+05	1,40E-04	6,34E-10
mCXCL11	3,69E+06	4,26E-03	1,17E-09
82Hu3	3,40E+05	4,82E-04	1,42E-09
53Ch	4,44E+04	7,07E-05	1,60E-09
CXCL11	2,58E+06	4,41E-03	1,72E-09
53Hu3	6,88E+04	1,13E-04	1,72E-09
82Hu2	8,67E+04	2,62E-04	3,02E-09
12Ch	9,66E+04	4,52E-04	5,00E-09
135Hu3	6,68E+04	3,35E-04	5,01E-09
82Ch	1,61E+05	8,92E-04	5,54E-09
53Hu2	3,05E+04	2,04E-04	6,70E-09
135Ch	5,52E+04	3,82E-04	6,93E-09
CXCL10	1,36E+05	1,27E-03	9,76E-09
12Hu3	6,60E+04	1,02E-03	1,56E-08
12Hu2	6,39E+04	1,02E-03	1,60E-08
CXCL9	datos de baja calidad		
135Hu2	Sin unión		
12Hu1			
53Hu1			
82Hu1			
135Hu1			

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
53Ch	4,44E+04	7,07E-05	1,60E-09
4Hu2	1,59E+05	8,18E-05	5,15E-10
4Hu3	1,54E+05	8,62E-05	5,60E-10
53Hu3	6,88E+04	1,13E-04	1,72E-09
4Ch	2,09E+05	1,15E-04	5,48E-10
4Hu1(UR baja)	2,24E+05	1,40E-04	6,34E-10
53Hu2	3,05E+04	2,04E-04	6,70E-09
82Hu2	8,67E+04	2,62E-04	3,02E-09
135Hu3	6,68E+04	3,35E-04	5,01E-09
135Ch	5,52E+04	3,82E-04	6,93E-09
12Ch	9,66E+04	4,52E-04	5,00E-09
82Hu3	3,40E+05	4,82E-04	1,42E-09
82Ch	1,61E+05	8,92E-04	5,54E-09
12Hu2	6,39E+04	1,02E-03	1,60E-08
12Hu3	6,60E+04	1,02E-03	1,56E-08
CXCL10	1,36E+05	1,27E-03	9,76E-09
mCXCL11	3,69E+06	4,26E-03	1,17E-09
CXCL11	2,58E+06	4,41E-03	1,72E-09
CXCL9	datos de baja calidad		
135Hu2	Sin unión		
12Hu1			
53Hu1			
82Hu1			
135Hu1			

Tabla 7B

Según se indica en la Tabla 7A, las mejores cuatro variantes por KD son el clon quimérico 4 (asociación rápida, disociación lenta), el clon Hu 3 4 (asociación rápida, disociación promedio), el clon Hu 3 82 (asociación rápida, disociación promedio), y el clon quimérico 53 (asociación promedio, disociación lenta).

- 5 La unión del anticuerpo se evaluó adicionalmente en células que expresaban CXCR3. Células 300.19 transfectadas con CXCR3 humano se pusieron en contacto con las variantes de anticuerpo anti-hCXCR3 humanizadas purificadas Hu1, Hu2, Hu3, y el anticuerpo quimérico. Como se muestra en la Figura 19 para cada uno de los clones 4, 12, 53, 82 y 135 a 5 µg/ml (línea negra), 0,5 µg/ml (línea gris oscura) o 0,1 µg/ml (línea punteada negra) o 5 µg/ml de anticuerpo secundario solo (histograma relleno gris). Las células se tiñeron con los clones de anticuerpo sin etiquetar
- 10 durante 30 min sobre hielo y posteriormente se lavaron dos veces con PBS-FBS al 1 % y el anticuerpo unido se detectó usando un anticuerpo secundario específico anti-IgG1 humana conjugado con FITC mediante incubación sobre hielo durante 30 min en la oscuridad. Las muestras se lavaron dos veces, se fijaron en una disolución de paraformaldehído al 2 % en PBS, se almacenaron en la oscuridad a 4 °C y se adquirieron en un citómetro de flujo. Los histogramas de la positividad de CXCR3 adquirido en células viables se muestran en la Figura 19.

- 15 Ejemplo 10: Comparación con el anticuerpo 1C6

El clon de mAb anti-hCXCR3 1C6 (Becton, N.º de catálogo de Dickinson 557183, igual al clon descrito en la patente estadounidense n.º 6.184.358) se comparó con el clon 4 del mAb anti-hCXCR3 de ratón y sus variantes humanizadas Hu2 y Hu3 usando el método de ensayo de receptor entero Biacore. El clon 4 exhibió una afinidad aproximadamente 2 veces mejor (KD). Las variantes humanizadas exhibieron afinidad mejorada adicionalmente

20 (aproximadamente 4 veces mejor afinidad para ambas variantes Hu2 y Hu3). La Tabla 8 indica la cinética de unión y la afinidad para el clon 1C6 y para el clon 4 y sus variantes humanizadas Hu2 y Hu3.

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1C6-Hibridoma	4,11 E+04	1,42E-04	3,51E-09
4-Hibridoma	1,18E+05	2,22E-04	1,88E-09
4Hu3	1,54E+05	8,62E-05	5,60E-10
4Hu2	1,59E+05	8,18E-05	5,15E-10

Tabla 8

Ejemplo 11: Ensayos funcionales

Se evaluaron los efectos funcionales de los veinte anticuerpos variantes. Los anticuerpos se evaluaron para determinar su efecto sobre la quimiotaxia celular en respuesta a CXCL9, CXCL10 y CXCL11, y la inhibición de la movilización de calcio mediante el ensayo de calcio FLIPR®.

La quimiotaxia de las células 300.19 transfectadas con CXCR3 humano con respecto a los ligandos de CXCR3 CXCL9, CXCL10 y CXCL11 se evaluó en presencia o ausencia de 10 µg/ml variantes de anticuerpo anti-CXCR3 humano humanizadas de los clones 4, 12, 53, 82 y 135. Las células transfectadas se pretrataron durante 20 min a 37 °C con 10 µg/ml de variantes de anticuerpo anti-CXCR3 humano humanizadas o el anticuerpo comercial 1C6. Las células con anticuerpo se transfirieron a transwells de 5 micrones y se colocaron insertos en el pocillo receptor que contenía 100 o 300 ng/ml de CXCL10 y CXCL11 o CXCL9 de ratón recombinantes, respectivamente. Las placas de quimiotaxia se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 4 h. Los insertos transwell se retiraron y las células que migraron hacia los pocillos receptores se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en U, se granularon y se resuspendieron en tinte calceína AM. Las células se incubaron durante 30 min a 37 °C, CO₂ al 5 %, se lavaron una vez, se transfirieron a una placa negra/transparente y se leyeron inmediatamente en la FlexStation a 490/520 nm. Los datos se presentan como porcentaje de inhibición de la quimiotaxia. La Figura 20 proporciona los datos representativos que muestran la capacidad de las diferentes variantes para cada uno de los cinco clones para inhibir la quimiotaxia para CXCL9, CXCL10 y CXCL11.

Para evaluar la inhibición de la movilización de calcio intracelular, se midió el flujo de calcio en células CHO transfectadas con CXCR3-Gq4q4 humano en respuesta a CXCL10 en presencia o ausencia de diversas concentraciones de variantes de anticuerpo anti-CXCR3 o el anticuerpo testigo positivo 1C6. Las células se sembraron (12 000/pocillo) en placas negras de 384 y se dejaron acoplar durante toda la noche. Al día siguiente, las células se cargaron con tinte sensible al calcio, el tinte Fluo-4NW, durante 40 min antes de la adición del anticuerpo y se incubaron a 37 °C. Se agregó el anticuerpo y se dejó incubarlo durante 20 min antes de la adición del ligando de CXCR3, CXCL10 humano recombinante, a la concentración CE₈₀ predeterminada de CXCL10. La adición del tinte se llevó a cabo manualmente usando una pipeta multicanal electrónica, pero la adición del anticuerpo y el agonista se automatizó en FLIPR Tetra® y la placa se leyó inmediatamente a 470-495 nm después de la adición de CXCL10. Las muestras se pasaron por duplicado y se graficó el porcentaje de inhibición promedio (± Desviación típica) para cada concentración de anticuerpo. El clon 4 Hu1 no inhibió la movilización de calcio y se usó como testigo negativo en estos experimentos. La Figura 21 muestra la capacidad de las diferentes variantes para cada uno de los cinco clones para inhibir la movilización de calcio y los compara con el clon comercial 1C6. Los valores CI50 representativos (M) de los anticuerpos con respecto a CXCL10 en el ensayo de movilización de calcio se muestran en la Tabla 9 a continuación.

	Clon 4	Clon 12	Clon 53	Clon 82	Clon 135	1C6
Hu1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-
Hu2	N/A	1,038E-06	1,675E-06	1,772E-06	N/A	-
Hu3	1,146E-06	8,636E-07	1,261 E-06	1,169E-06	1,499E-06	-
Quimérico	9,352E-07	1,204E-06	1,87E-06	6,778E-07	1,891E-06	3,135E-06*

Tabla 9

(*) en la Tabla 9 se indica que el anticuerpo 1C6 no es un anticuerpo quimérico, sino un anticuerpo de IgG1 de ratón completo contra CXCR3 humano.

Como se muestra en la Tabla 10, los datos de cinética de unión (véase el Ejemplo 9) se correlacionan bien con los resultados del ensayo funcional. En función de los datos de cinética de unión y los resultados del ensayo funcional, los clones 4 y 53 se seleccionaron para evaluación adicional y humanización 4D.

Tabla 10

Código de sombreado	Mejor	Promedio	Escaso								
Clon	Grupo de epitopo	Unión de péptido Octet		Unión de receptor entero Biacore			Ensayos in vitro				
		Respuesta	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Flujo	Quimiotaxia CXCL11	Quimiotaxia CXCL9	Primario CXCL10	FLIPR
4 quimérico	2	7.1859	6.57E-11	2.09E+05	1.15E-04	5.48E-10					
4 Hu1	2	3.5398	1.52E-08	2.24E+05	1.40E-04	6.34E-10					
4 Hu2	2	6.7746	3.78E-11	1.59E+05	1.70E-03	1.07E-08					
4 Hu3	2	6.8723	4.06E-11	2.28E+05	1.47E-04	6.40E-10					
12 quimérico	1	6.4498	<1.0E-12	9.66E+04	4.52E-04	5.00E-08					
12 Hu1	1	4.6044	9.54E-09	sin unión							
12 Hu2	1	6.9715	3.44E-10	6.39E+04	1.02E-03	1.60E-08					
12 Hu3	1	7.0274	<1.0E-12	6.60E+04	1.02E-03	1.56E-08					
53 quimérico	3	6.1886	<1.0E-12	4.44E+04	7.07E-05	1.80E-08					
53 Hu1	3	2.8452	5.27E-08	sin unión							
53 Hu2	3	6.0166	2.08E-11	3.05E+04	2.04E-04	6.70E-09					
53 Hu3	3	6.929	1.43E-11	6.88E+04	1.13E-04	1.72E-09					
82 quimérico	4	0.6554	<1.0E-12	1.61E+05	6.92E-04	5.54E-09					
82 Hu1	4	2.2913	3.81E-08	sin unión							
82 Hu2	4	6.225	4.89E-12	8.07E+04	2.62E-04	3.02E-09					
82 Hu3	4	6.1277	5.07E-12	3.40E+05	4.82E-04	1.42E-09					
135 quimérico	3	7.0143	<1.0E-12	5.52E+04	3.82E-04	6.93E-09					
135 Hu1	3	0.0289	5.74E-05	sin unión							
135 Hu2	3	0.9256	4.06E-08	sin unión							
135 Hu3	3	7.1572	2.42E-11	6.88E+04	3.35E-04	5.01E-09					

Ejemplo 12: Humanización 4D

La humanización 4D de los clones de anticuerpo anti-hCXCR3 se lleva a cabo según se describe en WO 2009/032661 (p. ej., en los párrafos [0037]-[0044]). De manera resumida, la humanización 4D comprende: a) construir un modelo 3-D del dominio variable que se va a humanizar; b) identificar los residuos flexibles en el dominio variable mediante el uso de una simulación de dinámica molecular del modelo 3-D del dominio; c) identificar la línea germinal humana más próxima al comparar la trayectoria de la dinámica molecular del modelo 3-D con las trayectorias de la dinámica molecular de 49 líneas germinales humanas (en lugar de una comparación de las secuencias de anticuerpo, según se hace en la humanización tradicional); y d) mutar los residuos flexibles, que no son parte de la CDR, en su contraparte de la línea germinal humana (según se identificó en la etapa c). Las cadenas pesadas 4.4-4.6 y las cadenas ligeras 4.4-4.7 se diseñaron usando este método. En particular, se diseñó una construcción humanizada 4D inicial (VH 4.4 y VL 4.4) y después se diseñaron modificaciones adicionales a la cadena pesada y ligera (VH 4.5-4.6 y VL 4.5-4.7) para introducir mutaciones de estabilización y antiaglomeración y para eliminar otros motivos indeseados. También se usaron métodos similares para diseñar las construcciones humanizadas 4D VH 53.7-53.10 y VL 53.10-53.13.

La Tabla 11 indica la estrategia de humanización (y las modificaciones adicionales, según corresponda) usada para preparar las variantes de cadena pesada y ligera para los clones 4, 12, 53, 82, y 135, incluidas las cadenas humanizadas y humanizadas 4D (VH = cadena pesada; VK = cadena ligera).

Se evaluaron diversas variantes 4D del clon 4 (4Hu6, 4Hu7, 4Hu8, 4Hu9, 4Hu10) mediante el ensayo de receptor entero Biacore para evaluar la cinética de unión y la afinidad por CXCR3 y se compararon con el anticuerpo quimérico clon 4. Como se muestra en la Tabla 2, el clon 4Hu6 contenía la cadena pesada 4.4 y la cadena ligera 4.4. El clon 4Hu7 contenía la cadena pesada 4.4 y la cadena ligera 4.7. El clon 4Hu8 contenía la cadena pesada 4.5 y la cadena ligera 4.5. El clon 4Hu9 contenía la cadena pesada 4.5 y la cadena ligera 4.6. Y el clon 4Hu10 contenía la cadena pesada 4.6 y la cadena ligera 4.4.

Como se muestra en la Tabla 12, cuando las variantes de modelado 4D del clon 4 se compararon con la variante quimérica (4Ch), cuatro de las cinco variantes exhibieron afinidad mejorada (KD). La variante 4D 4Hu10, sin embargo, exhibió afinidad reducida en casi 1 orden de magnitud.

Clon	Variante de cadena pesada/ligera	estrategia
4	VH1	Injerto de CDR

ES 2 698 606 T3

Clon	Variante de cadena pesada/ligera	estrategia
4	VH2	Injerto de CDR
4	VH3	Injerto de CDR
4	VH4	Modelado 4D
4	VH5	Modelado 4D, incluye mutaciones de estabilización
4	VH6	Modelado 4D, incluye mutaciones para retirar los motivos indeseados
4	VH7	Injerto de CDR, modificación de VH 4.2 en los residuos NG>QG para retirar el sitio de desamidación de CDR2
4	VH8	Injerto de CDR, modificación de VH 4.2 en los residuos NG>NL para retirar el sitio de desamidación de CDR2
4	VH9	Modificación de VH 4.2 en los residuos NG>NS para retirar el sitio de desamidación de CDR2
4	VH10	Modificación de VH 4.2 en los residuos NG>DG para retirar el sitio de desamidación de CDR2
4	VH11	Modificación de VH 4.2 en los residuos NG>NV para retirar el sitio de desamidación de CDR2
4	VK1	Injerto de CDR
4	VK2	Injerto de CDR
4	VK3	Injerto de CDR
4	VK4	Modelado 4D
4	VK5	Modelado 4D, incluye mutaciones de estabilización
4	VK6	Modelado 4D, incluye otras mutaciones de estabilización
4	VK7	Modelado 4D, incluye mutaciones antiaglomeración
53	VH1	Injerto de CDR
53	VH2	Injerto de CDR
53	VH3	Injerto de CDR
53	VH4	modificación de VH 4.2 en el residuo T50>V - retromutación para incorporar el residuo VH 4.1
53	VH5	modificación de VH 4.2 en el residuo P61>A - retromutación para incorporar el residuo VH 4.1

ES 2 698 606 T3

Clon	Variante de cadena pesada/ligera	estrategia
53	VH6	modificación de VH 4.2 en el residuo M93>V - retromutación para incorporar el residuo VH 4.1
53	VH7	Modelado 4D
53	VH8	Modelado 4D
53	VH9	Modelado 4D
53	VH10	Modelado 4D
53	VK1	Injerto de CDR
53	VK2	Injerto de CDR
53	VK3	Injerto de CDR
53	VK4	modificación de VK 4.2 en el residuo I32>L - retromutación para incorporar el residuo VK1
53	VK5	modificación de VK 4.2 en el residuo Y33>A - retromutación para incorporar el residuo VK1
53	VK6	modificación de VK 4.2 en el residuo N52>T - retromutación para incorporar el residuo VK1
53	VK7	modificación de VK 4.2 en el residuo A54>Q - retromutación para incorporar el residuo VK1
53	VK8	modificación de VK 4.2 en el residuo P55>S - retromutación para incorporar el residuo VK1
53	VK9	modificación de VK 4.2 en el residuo G99>Q - retromutación para incorporar el residuo VK1
53	VK10	Modelado 4D
53	VK11	Modelado 4D
53	VK12	Modelado 4D
53	VK13	Modelado 4D
12	VH1	Injerto de CDR
12	VH2	Injerto de CDR
12	VH3	Injerto de CDR
12	VK1	Injerto de CDR
12	VK2	Injerto de CDR

Clon	Variante de cadena pesada/ligera	estrategia
12	VK3	Injerto de CDR
82	VH1	Injerto de CDR
82	VH2	Injerto de CDR
82	VH3	Injerto de CDR
82	VK1	Injerto de CDR
82	VK2	Injerto de CDR
82	VK3	Injerto de CDR
135	VH1	Injerto de CDR
135	VH2	Injerto de CDR
135	VH3	Injerto de CDR
135	VK1	Injerto de CDR
135	VK2	Injerto de CDR
135	VK3	Injerto de CDR

Tabla 11

Curva	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
4Ch	1,71E+05	8,57E-05	5,09E-10
4Hu6	4,76E+05	1,55E-04	3,27E-10
4Hu7	4,12E+05	1,33E-04	3,26E-10
4Hu8	3,27E+05	1,13E-04	3,49E-10
4Hu9	3,48E+05	1,34E-04	3,87E-10
4Hu10	3,55E+05	1,05E-03	2,96E-09

Tabla 12

Ejemplo 13: Modelo de ratón NSG-PBL

- 5 Los ratones NOD-*scid* *IL2 γ* ^{null} (NSG) se inyectaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) aisladas en ficoll humanas primarias nuevas 2E7 el día 0. Los animales (n=8/grupo) se trataron con 5mg/kg de anticuerpos quiméricos anti-CXCR3 humano o IgG1 humana testigo (Herceptina) dos veces a la semana durante todo el estudio comenzando el día 3 después de la transferencia celular. La sangre tomada el día 14 después del inicio se procesó para citometría de flujo y se tiñó usando procedimientos estándares con los anticuerpos para CD45 humano (hCD45), CD3 humano (hCD3), CD4 humano (hCD4), CD8 humano (hCD8) y CXCR3 humano. Las células en la ventana de adquisición de linfocitos se adquirieron en células hCD45+ y
- 10 posteriormente mediante adquisición en células hCD3+. Se evaluó la expresión de hCD4 y hCD8 en los linfocitos T hCD45+hCD3+ y se determinó el porcentaje de linfocitos T CD4+CD45+CD3+ humanos y linfocitos T

5 CD8+C45+CD3+ humanos. Se determinó el porcentaje de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ humanos que expresaban CXCR3. Cada punto en la Figura 22 representa un único ratón, con datos representativos que se muestran a partir de tres experimentos. Los datos muestran que el tratamiento con el anticuerpo anti-CXCR3 en el modelo de ratón NSG-PBL de GvHD xenogéneo (enfermedad de injerto contra hospedante) resultó en la modulación de los linfocitos T que expresan CXCR3, pero revela diferencias funcionales entre los cinco clones.

La Tabla 13 muestra la mediana de supervivencia de los ratones NSG-PBL con GvHD xenogéneo después del tratamiento con anticuerpos candidatos anti-CXCR3 humano quiméricos.

Tratamiento	Mediana de supervivencia (días)
PBS	31
hulgG1	33,5
Clon 4 quimérico	43**
Clon 12 quimérico	41
Clon 53 quimérico	44*
Clon 82 quimérico	36,5
Clon 135 quimérico	45***

Tabla 13

10 *, p = 0,043; ** p = 0,016; *** p = 0,010 tratamiento con anticuerpo anti-CXCR3 con respecto a tratamiento con hulgG1 usando la prueba del orden logarítmico.

Se pretende que los ejemplos precedentes ilustren y de ningún modo limiten la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno capaz de unirse a CXCR3, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende seis regiones de determinación de la complementariedad (CDR): CDR1 de dominio variable de cadena pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de dominio variable de cadena ligera (VL) CDR2 de VL y CDR3 de VL, en donde:
5 la CDR1 de VH tiene la secuencia de aminoácidos GFTFTSYA;
la CDR2 de VH tiene la secuencia de aminoácidos ISHGGTYT;
la CDR3 de VH tiene la secuencia de aminoácidos ARHPIYSGNYQGYFDY;
la CDR1 de VL tiene la secuencia de aminoácidos SGVNY;
10 la CDR2 de VL tiene la secuencia de aminoácidos FTS; y
la CDR3 de VL tiene la secuencia de aminoácidos QQFTSSPYT.
2. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento es quimérico, injertado con CDR, mutado, humano, humanizado, sintético o recombinante.
3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo o fragmento es capaz de unirse a un polipéptido que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en:
15 a) un péptido que comprende los residuos 1-58 de la SEQ ID NO:1;
b) un péptido que comprende los residuos 1-16 de la SEQ ID NO:1; y
c) un péptido que comprende los residuos 1-37 de la SEQ ID NO:1.
4. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o fragmento es capaz de unirse a un polipéptido que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en:
20 a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SDHQVLNDAE;
b) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SDHQVLND;
c) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos DHQVLND;
d) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos VLNDAE;
25 e) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos VLND;
f) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos XDXXVXNDXX;
g) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos XDXXVXND;
h) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos DXXVXND;
i) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos VXNDXX; y
30 j) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos VXND,
en donde X indica cualquier aminoácido.
5. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:48.
- 35 6. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 5, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:48.
7. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:
la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 38, 40, 42, 44, 46-48, y 63-66; y
40 la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 39, 41, 43, 45, 49-54 y 67-70; y

la CDR1 de VH, la CDR2 de VH, la CDR3 de VH, la CDR1 de VL, la CDR2 de VL y la CDR3 de VL son 100 % idénticas a las de la reivindicación 1.

8. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 7, en donde:

5 la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 38, 40, 42, 44, 46-48, y 63-66; y

la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 39, 41, 43, 45, 49-54 y 67-70.

10 9. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:48; y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 41.

10. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:48; y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 41.

15 11. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el anticuerpo o fragmento comprende una combinación de regiones variables de cadena pesada y cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 38 y 39; SEQ ID NOs: 40 y 41; SEQ ID NOs: 42 y 43; SEQ ID NOs: 44 y 45; SEQ ID NOs: 40 y 43; SEQ ID NOs: 42 y 41; SEQ ID NOs: 42 y 49; SEQ ID NOs: 42 y 50; SEQ ID NOs: 42 y 51; SEQ ID NOs: 42 y 52; SEQ ID NOs: 42 y 53; SEQ ID NOs: 42 y 54; SEQ ID NOs: 46 y 43; SEQ ID NOs: 47 y 43; SEQ ID NOs: 48 y 43; SEQ ID NOs: 40 y 49; SEQ ID NOs: 40 y 51; SEQ ID NOs: 48 y 49; SEQ ID NOs: 48 y 51; SEQ ID NOs: 63 y 67; y SEQ ID NOs: 63 y 68.

12. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el anticuerpo o fragmento es capaz de unirse preferencialmente a la isoforma A de CXCR3.

13. Un ácido nucleico aislado que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

25 14. Un método para producir el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende cultivar una célula hospedante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13 en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para producir el anticuerpo o fragmento.

15. Un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en un tratamiento para prevenir, tratar o reducir la progresión de la diabetes tipo 1 (T1D) de aparición reciente.

30 16. El anticuerpo o fragmento de este para el uso de la reivindicación 15, en donde dicho anticuerpo o fragmento de este se administra a una dosis de aproximadamente 0,03-3,7 mg/kg/dosis.

17. El anticuerpo o fragmento de este para el uso de la reivindicación 15 o 16, en donde dicho anticuerpo o fragmento de este se administra a una dosis total en todas las administraciones de aproximadamente 0,16-18 mg/kg.

35 18. El anticuerpo o fragmento de este para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en donde dicho anticuerpo o fragmento de este se administra a un sujeto humano que padece T1D de aparición reciente y que tiene un nivel sérico basal de péptido C mayor o igual que aproximadamente 0,2 nmol/L, y/o que tiene un nivel sérico integrado de péptido C en ayunas durante la estimulación con péptido C de entre aproximadamente 0,033 y 1,0 nmol/L x min.

40 19. Un conjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y al menos un agente adicional, en donde dicho agente adicional es un agente terapéutico, un agente solubilizante, un agente estabilizante, un inmunosupresor, un receptor o un péptido de unión a antígeno.

20. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o el ácido nucleico de la reivindicación 13, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 21. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde la composición comprende, además, al menos un agente terapéutico adicional seleccionado del grupo que consiste en un agente estimulante de células β , insulina y una célula productora de insulina.

50 22. Un método *in vitro* para detectar la presencia o concentración de CXCR3 en una muestra de prueba, que comprende poner en contacto la muestra de prueba con el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y una etiqueta detectable, en donde la presencia o concentración de CXCR3 se correlaciona directa o indirectamente con una señal generada por la etiqueta detectable.

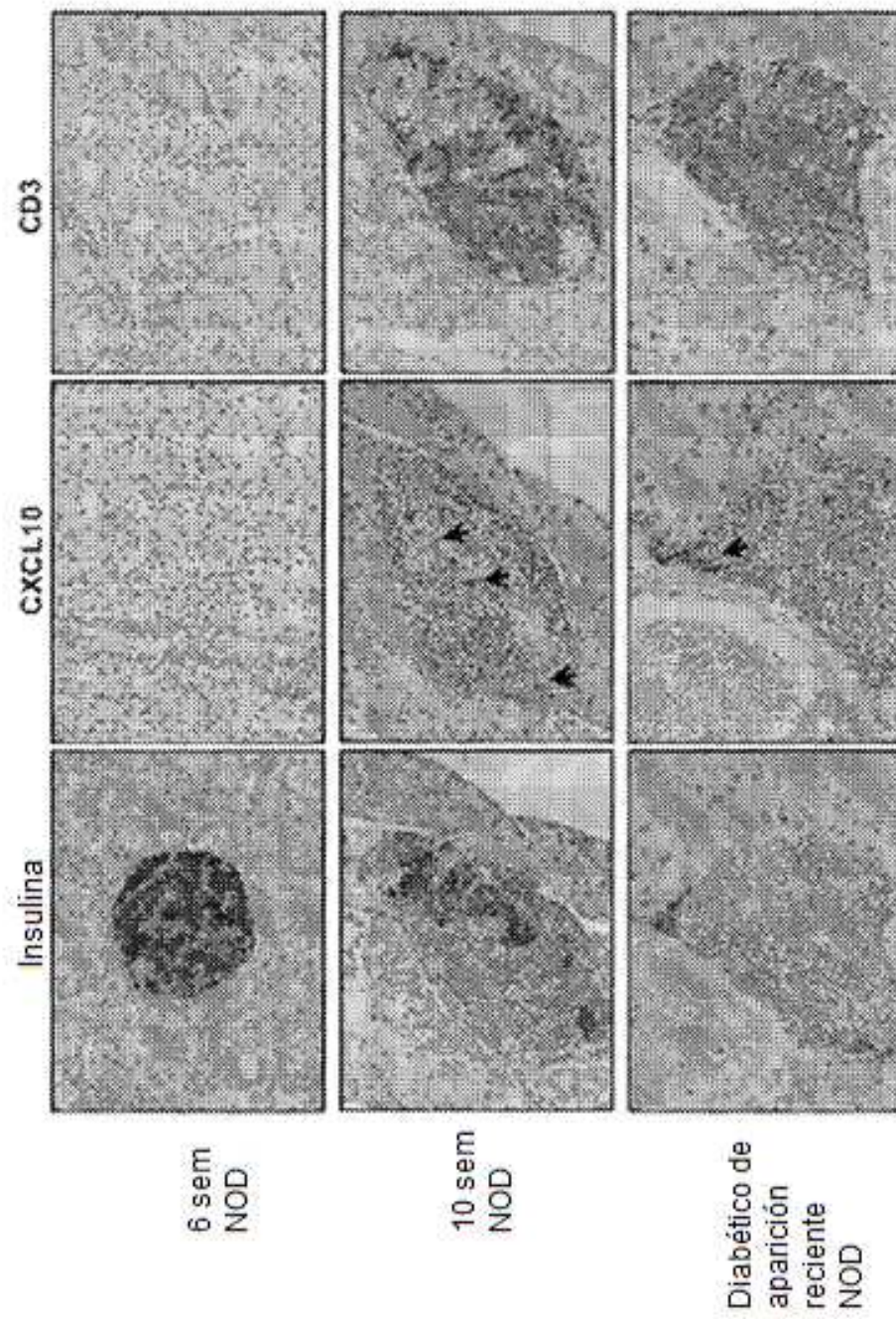


Fig. 1

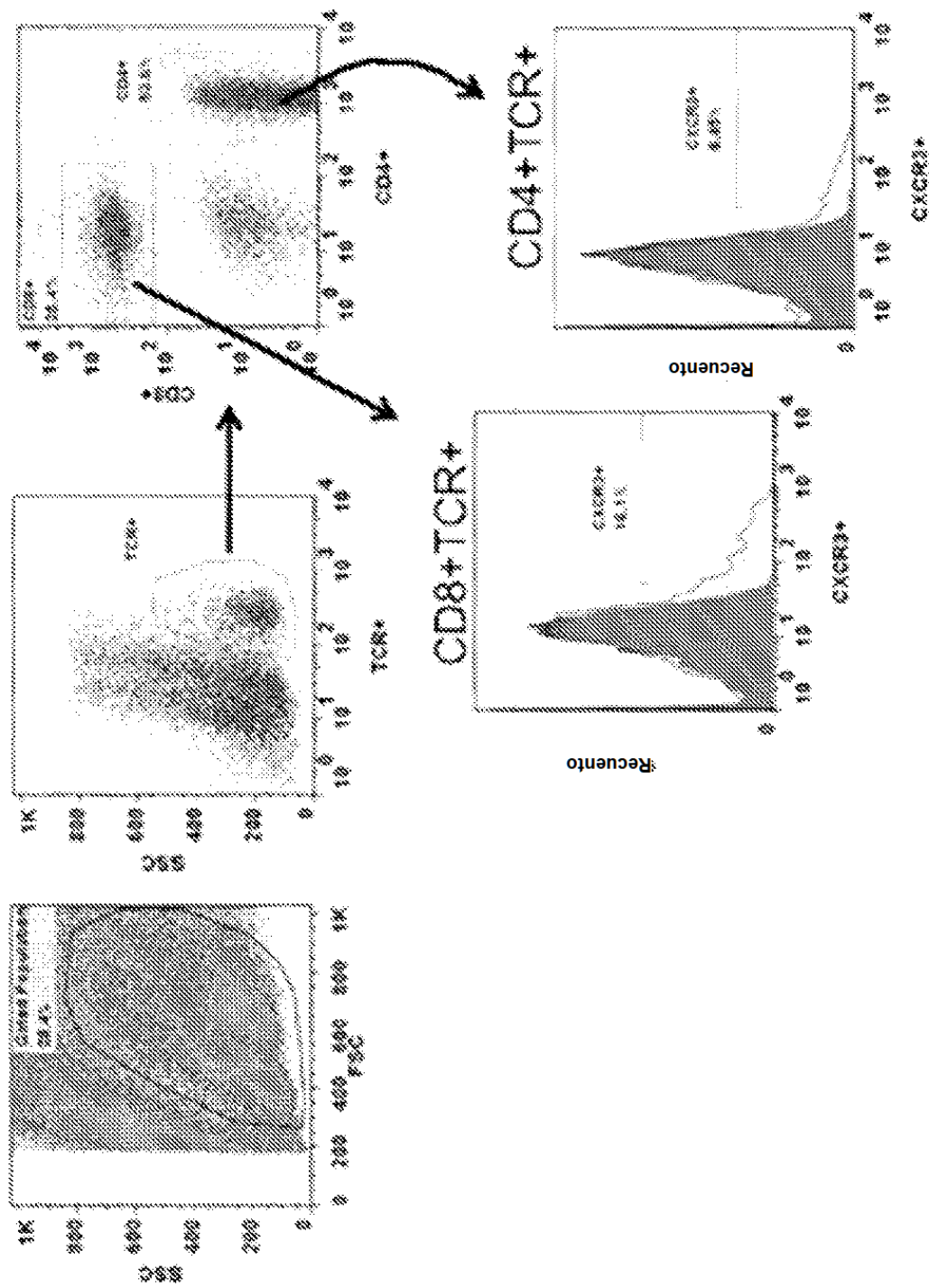


Fig. 2

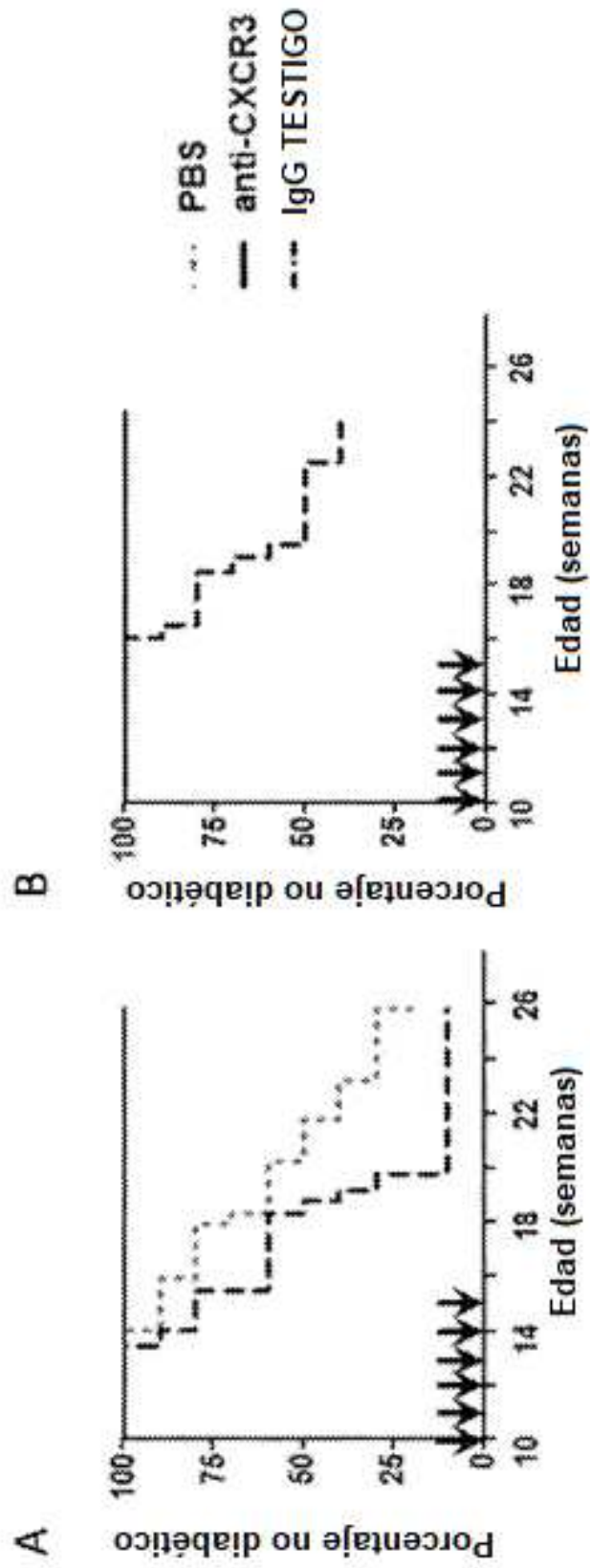


Fig. 3

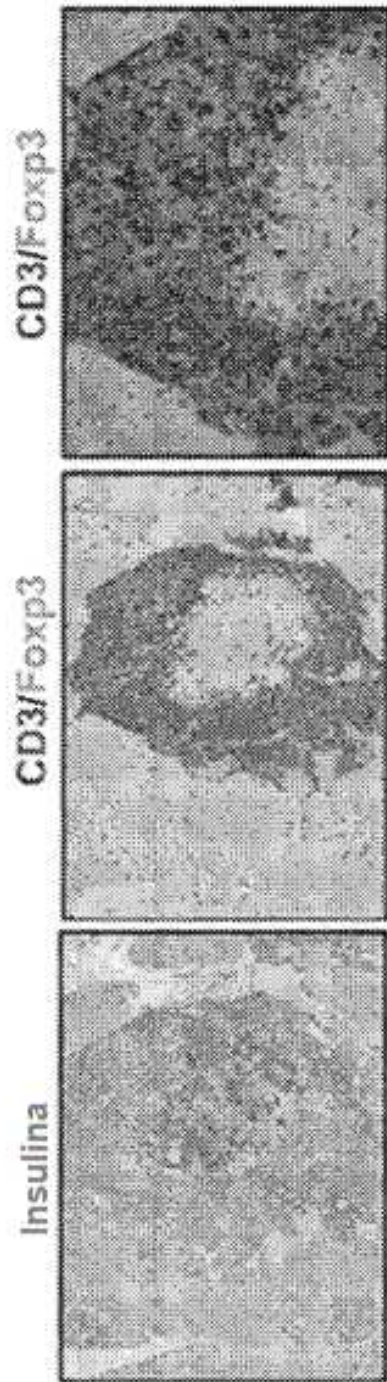


Fig. 4

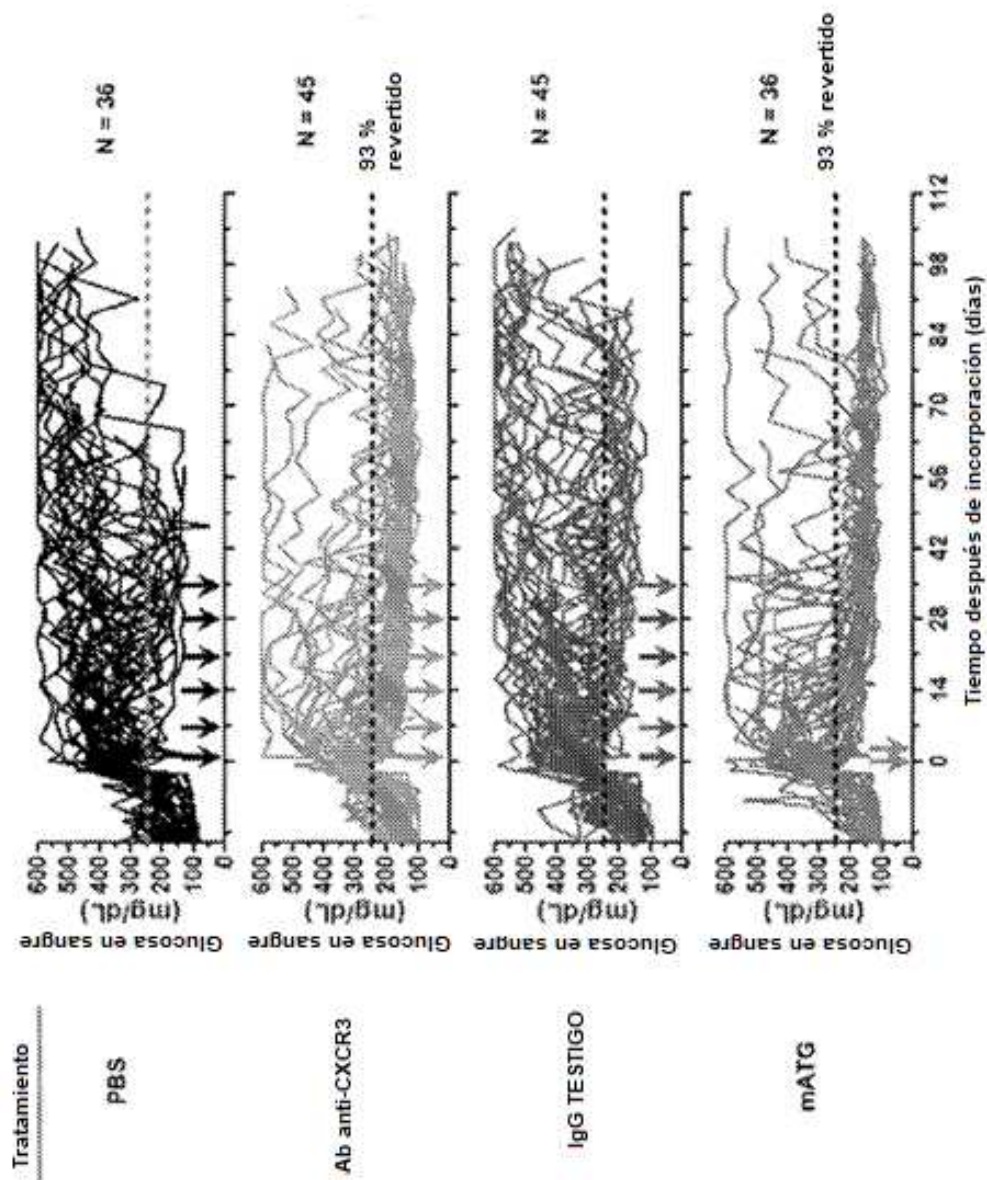


Fig. 5

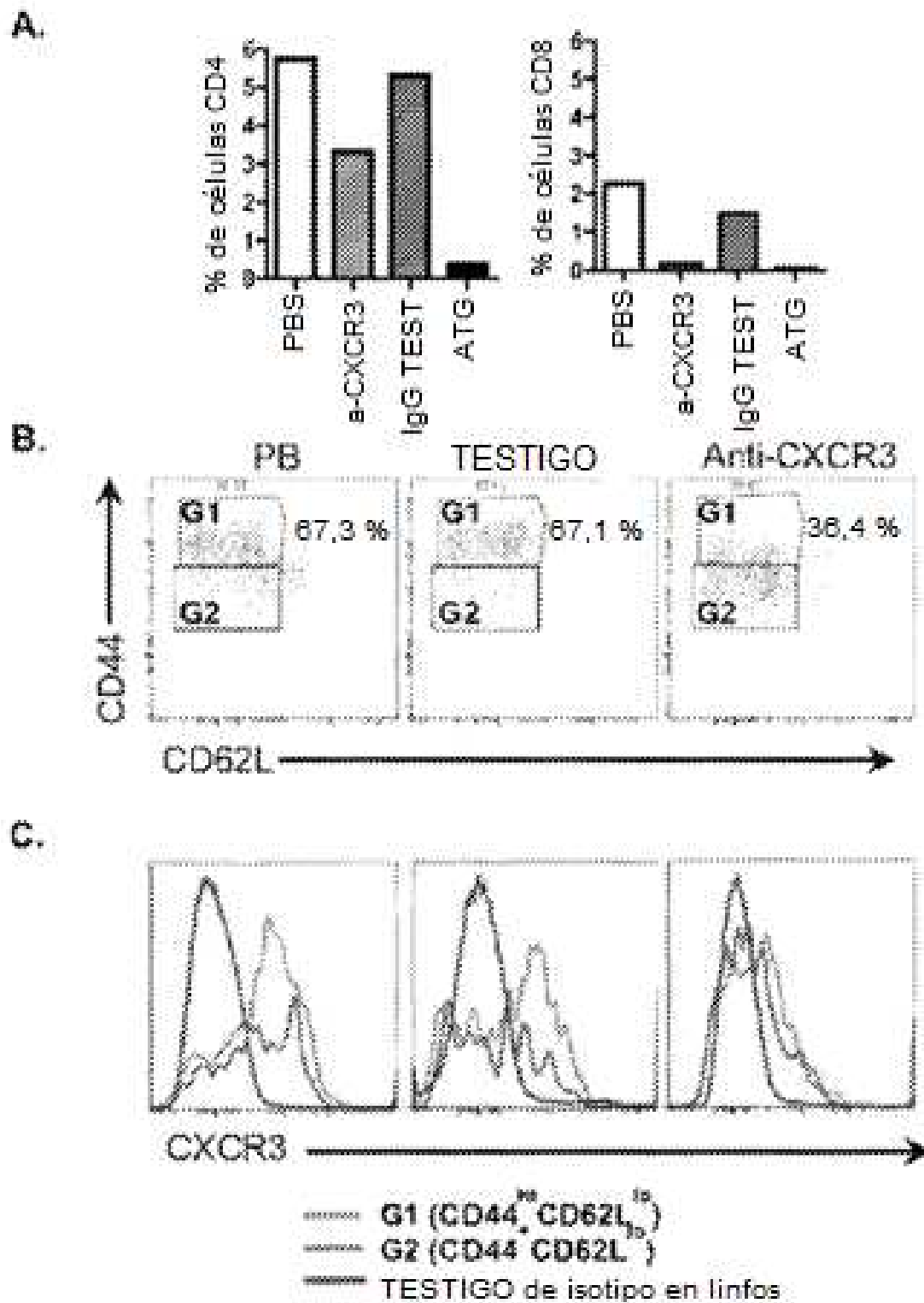


Fig. 6

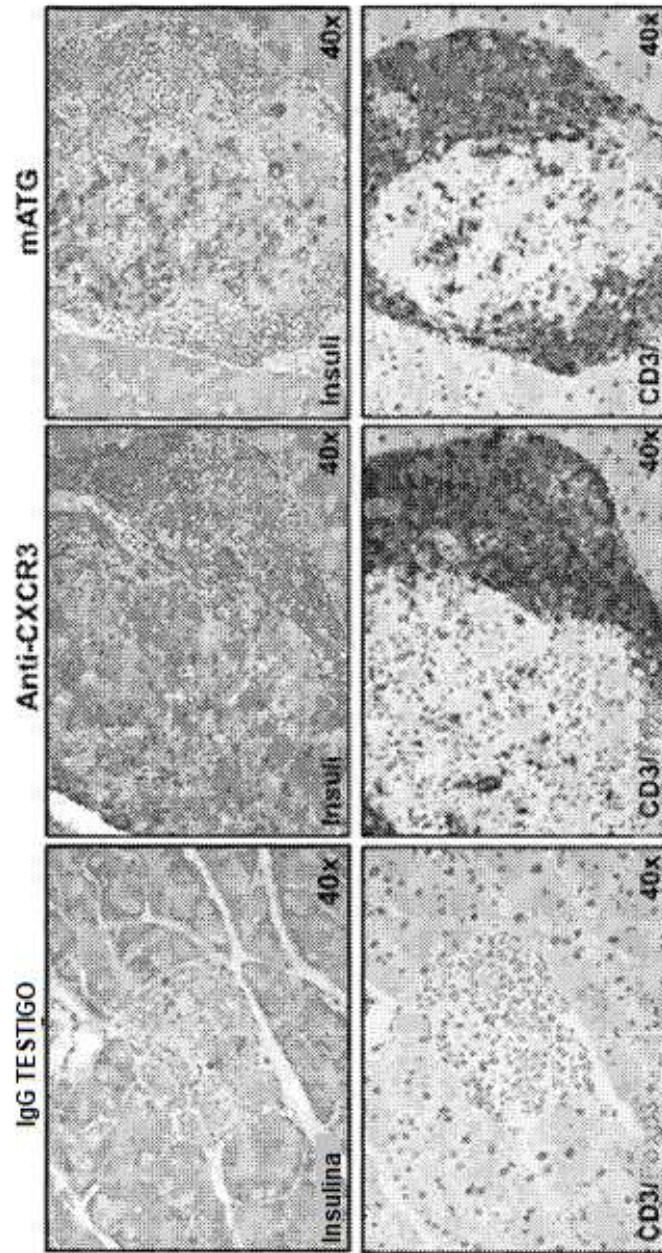


Fig. 7

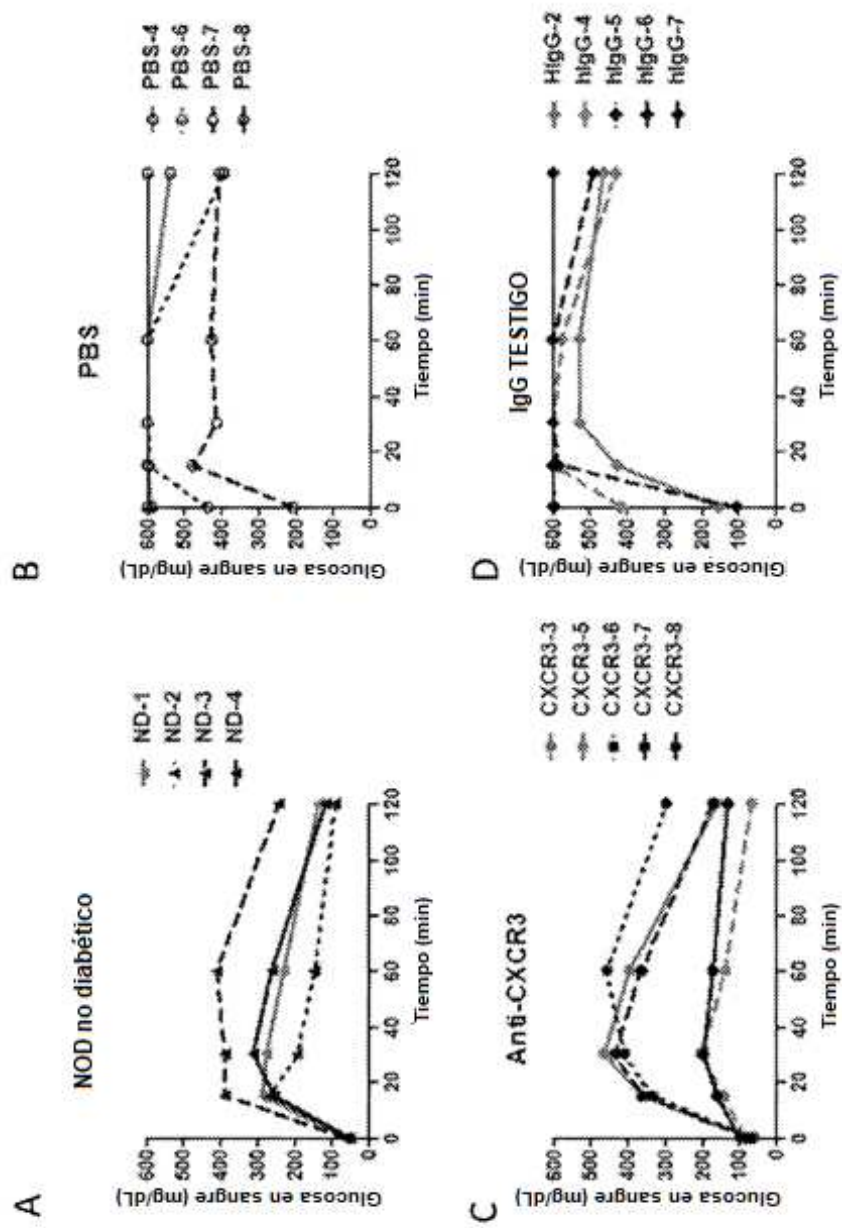


Fig. 8

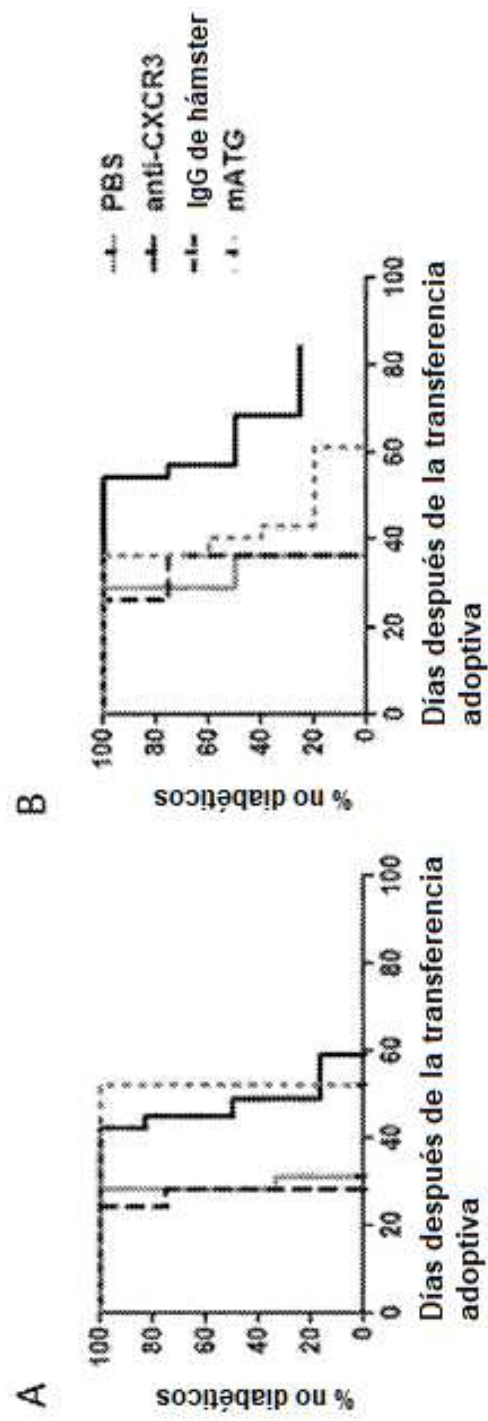


Fig. 9

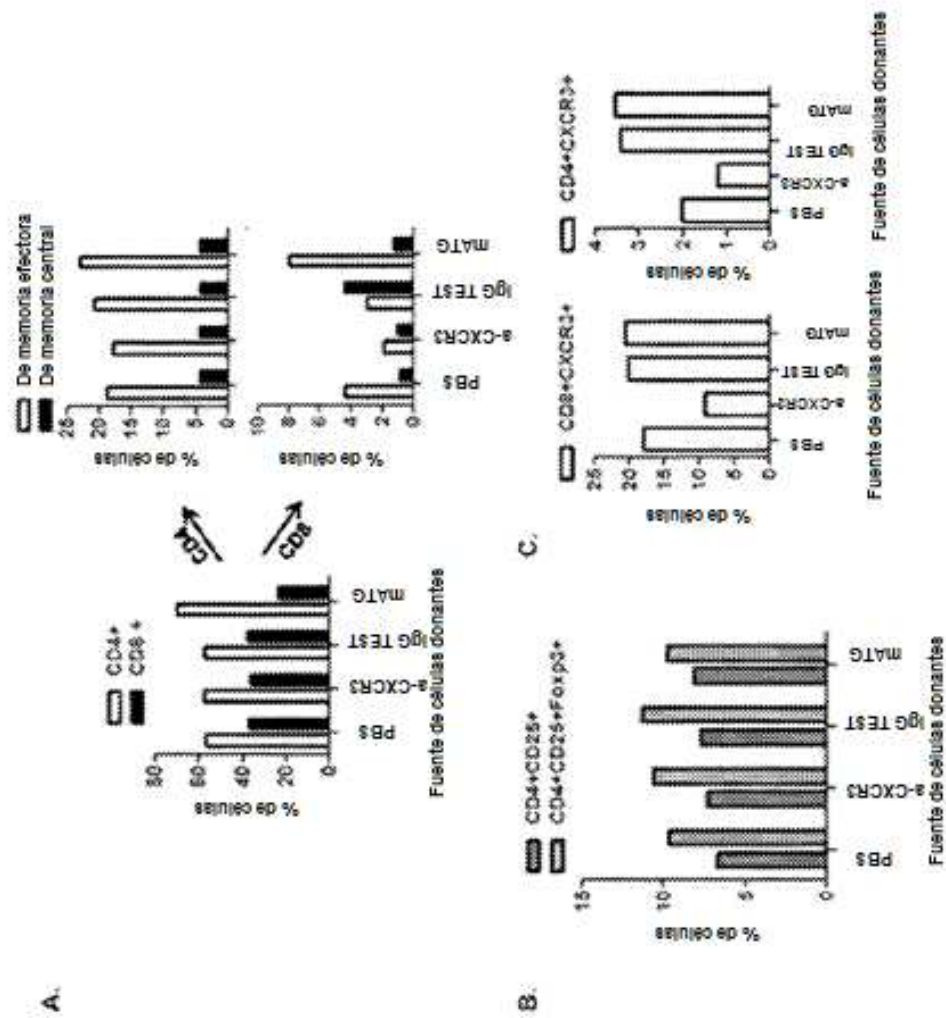


Fig. 10

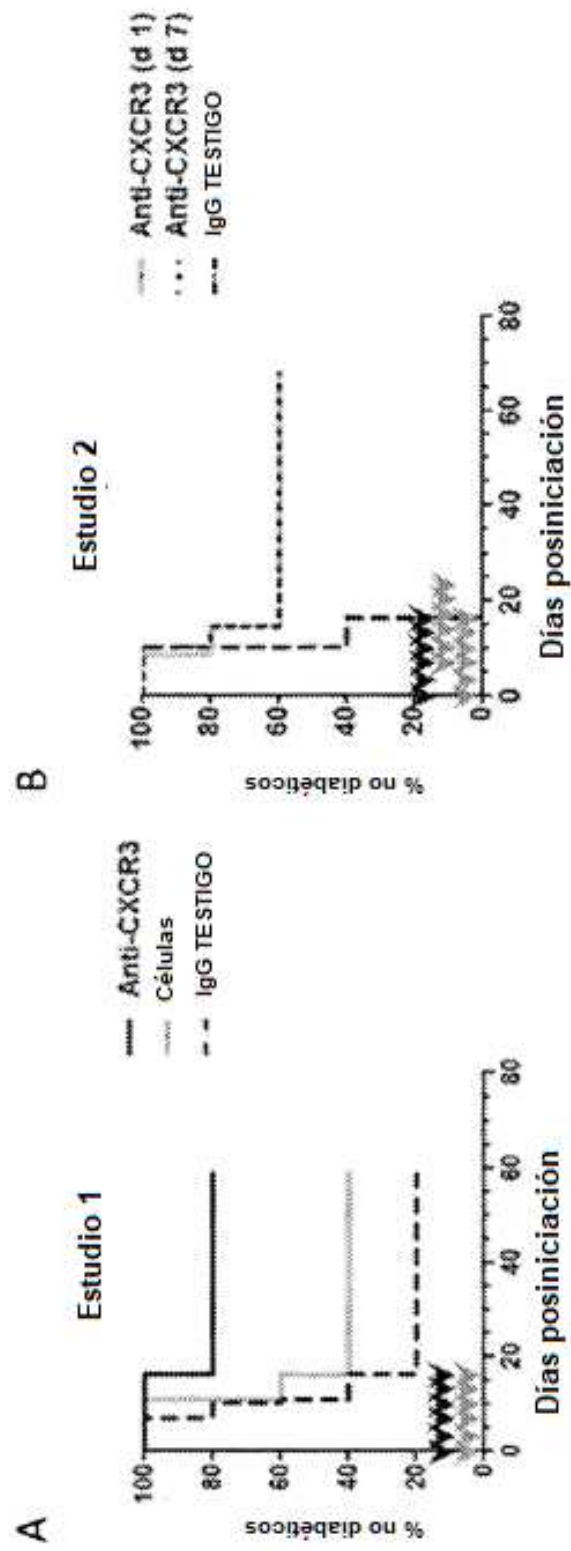
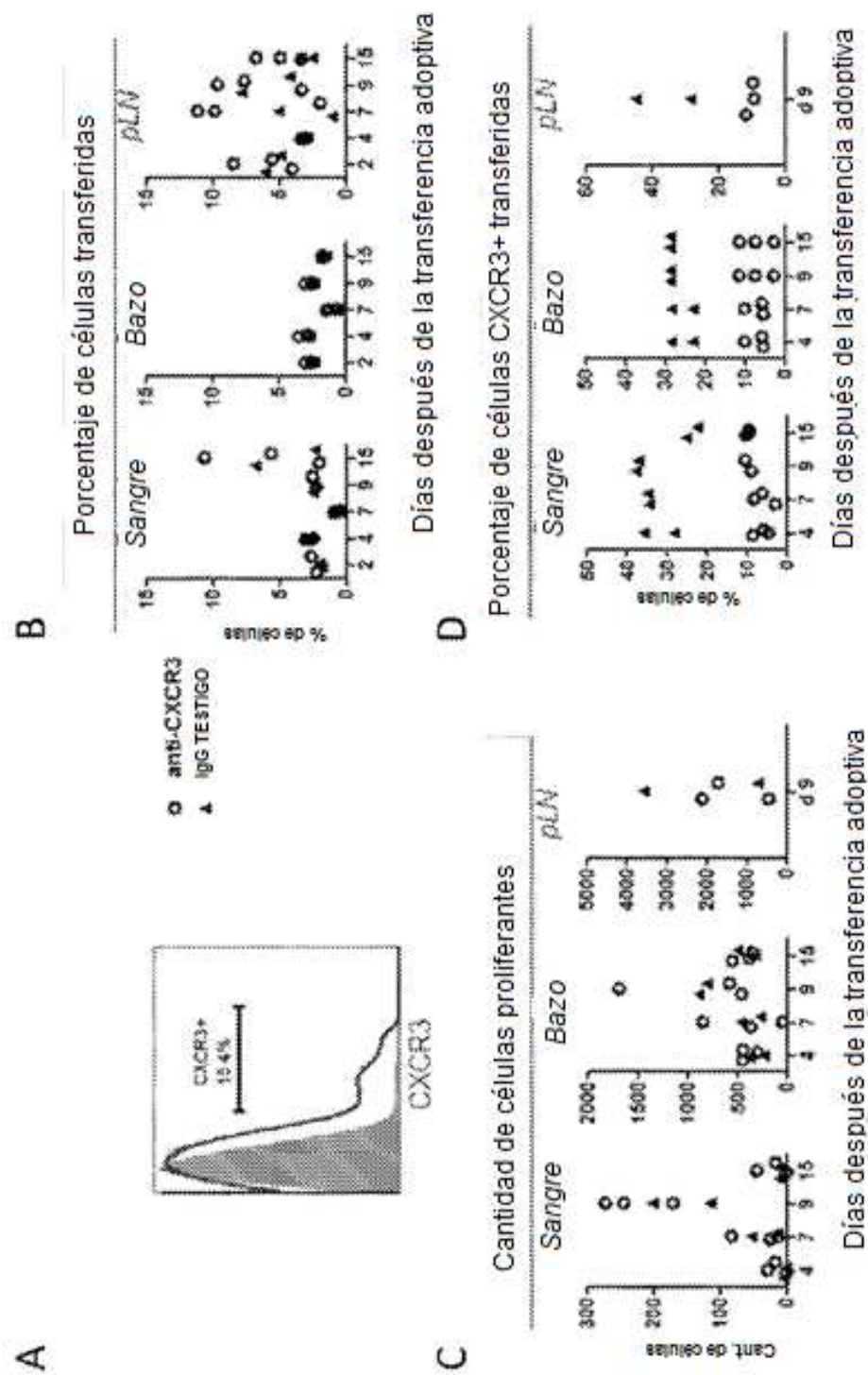


Fig. 11



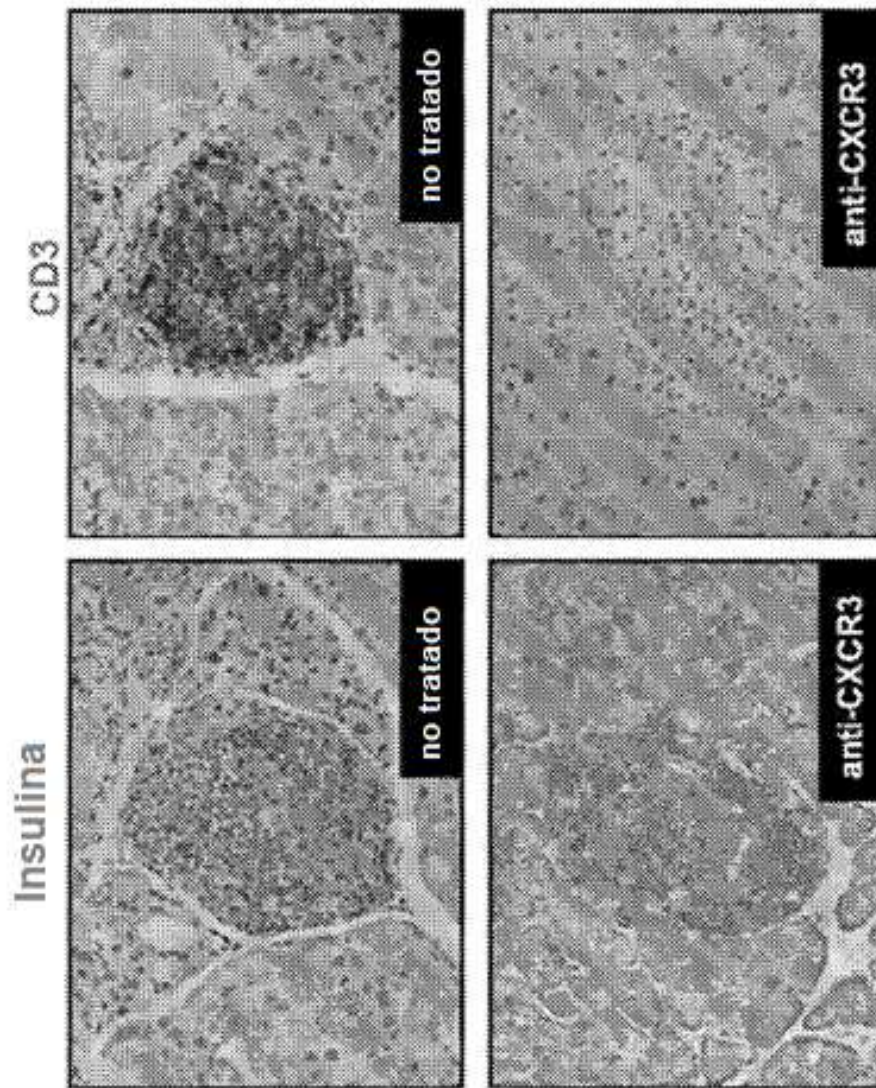


Fig. 13

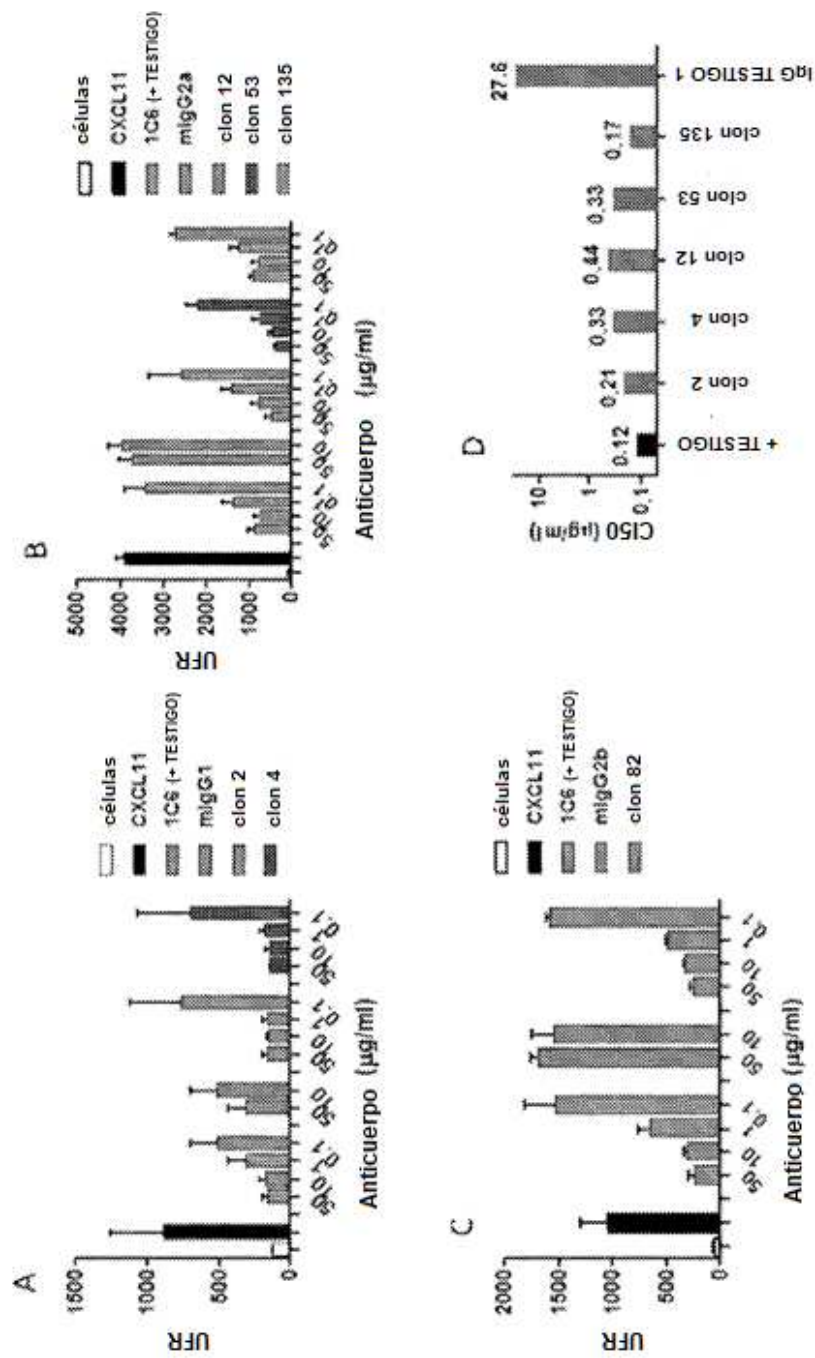


Fig. 14

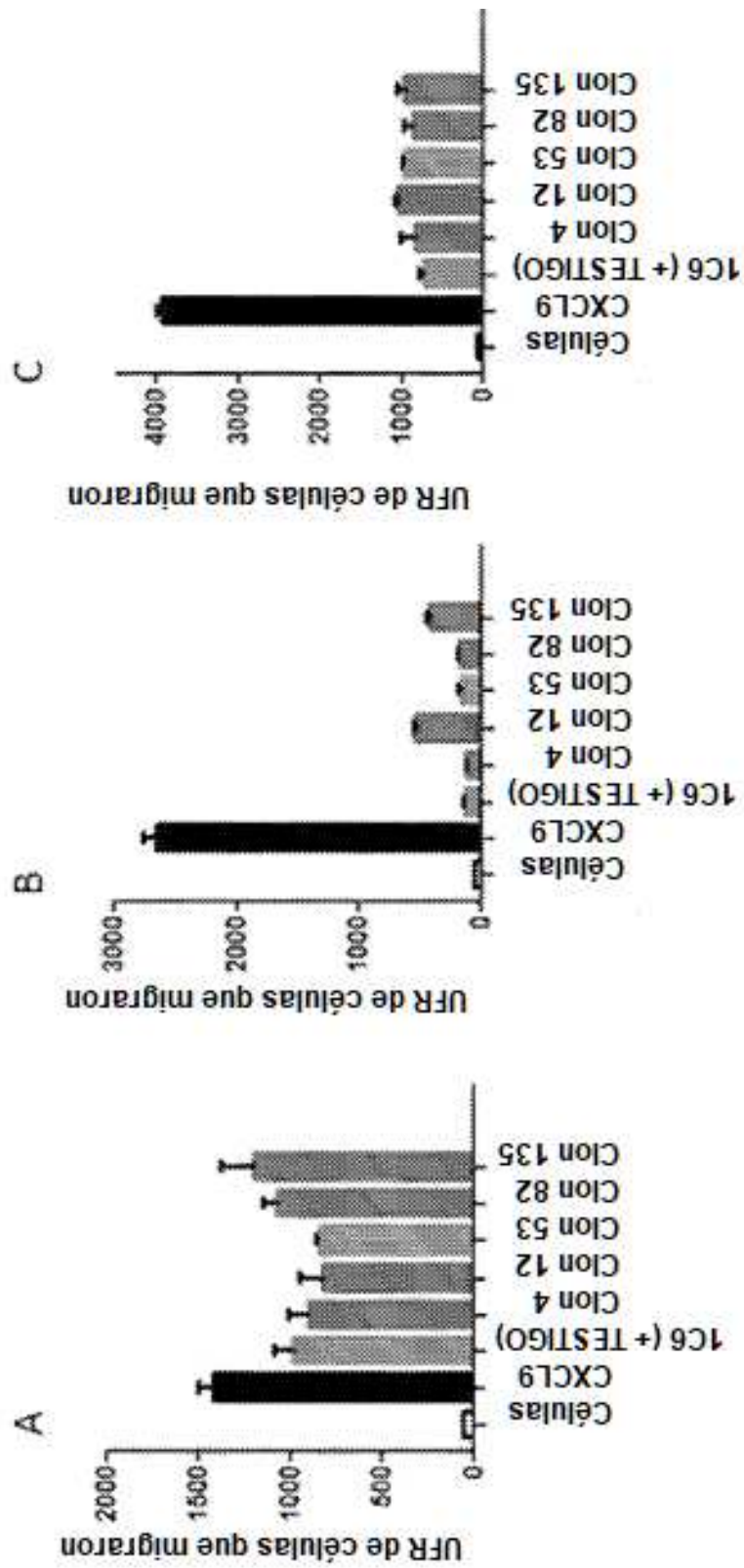


Fig. 15

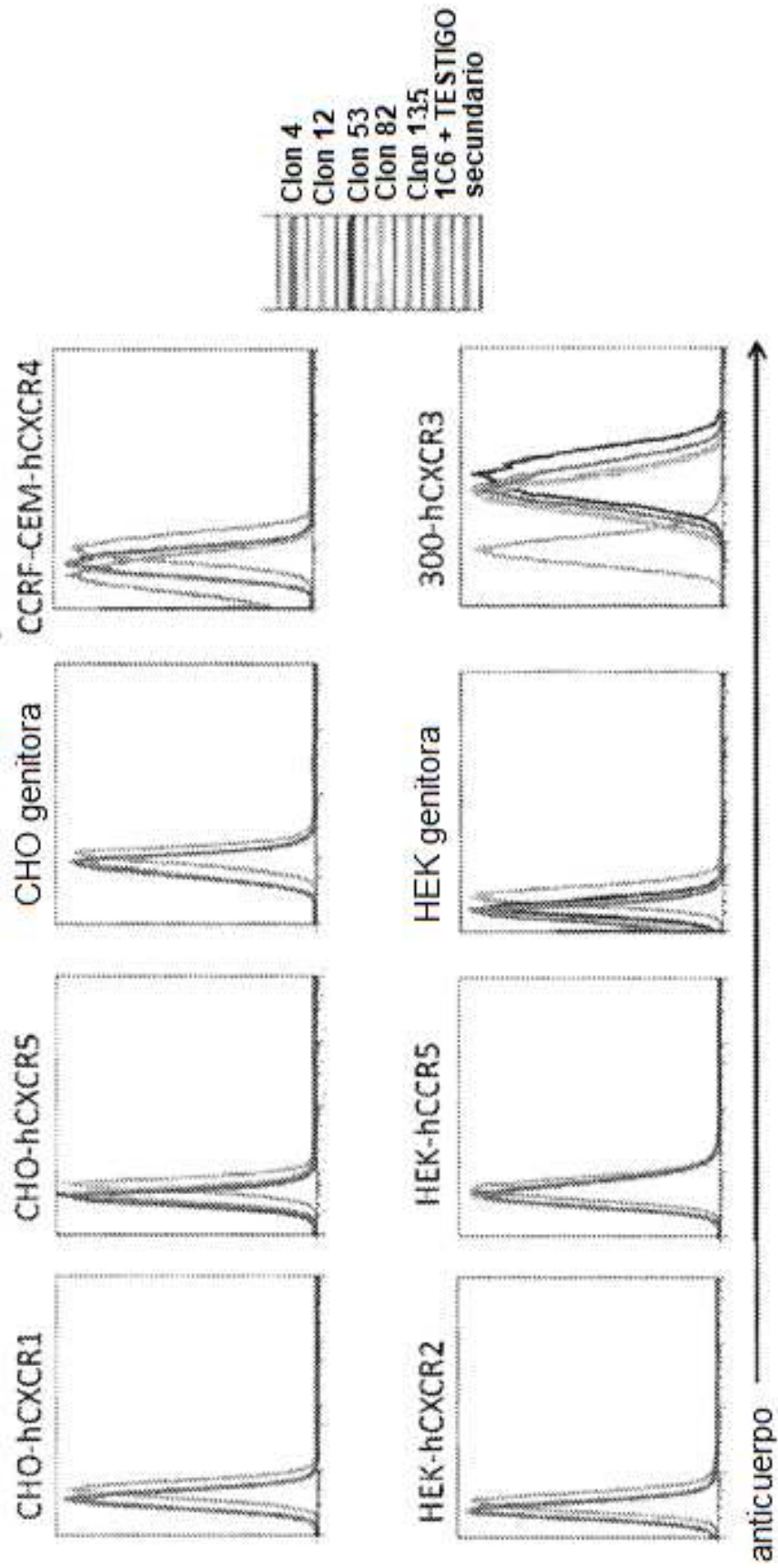


Fig. 16

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80																				

Fig. 17A

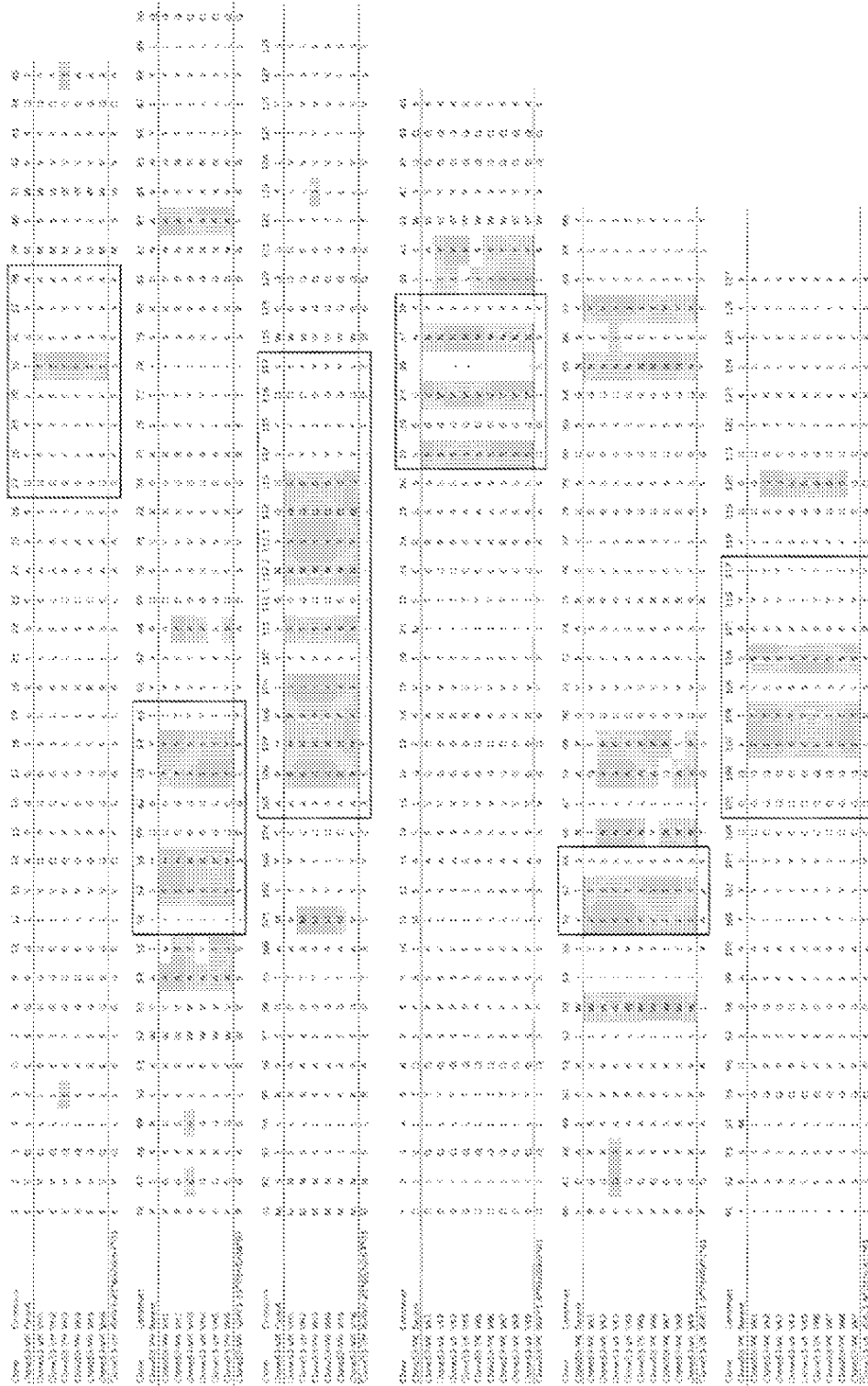


Fig. 17C

Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Class	Countdown	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15																														

Fig. 17E

[illegible]

Fig. 17F

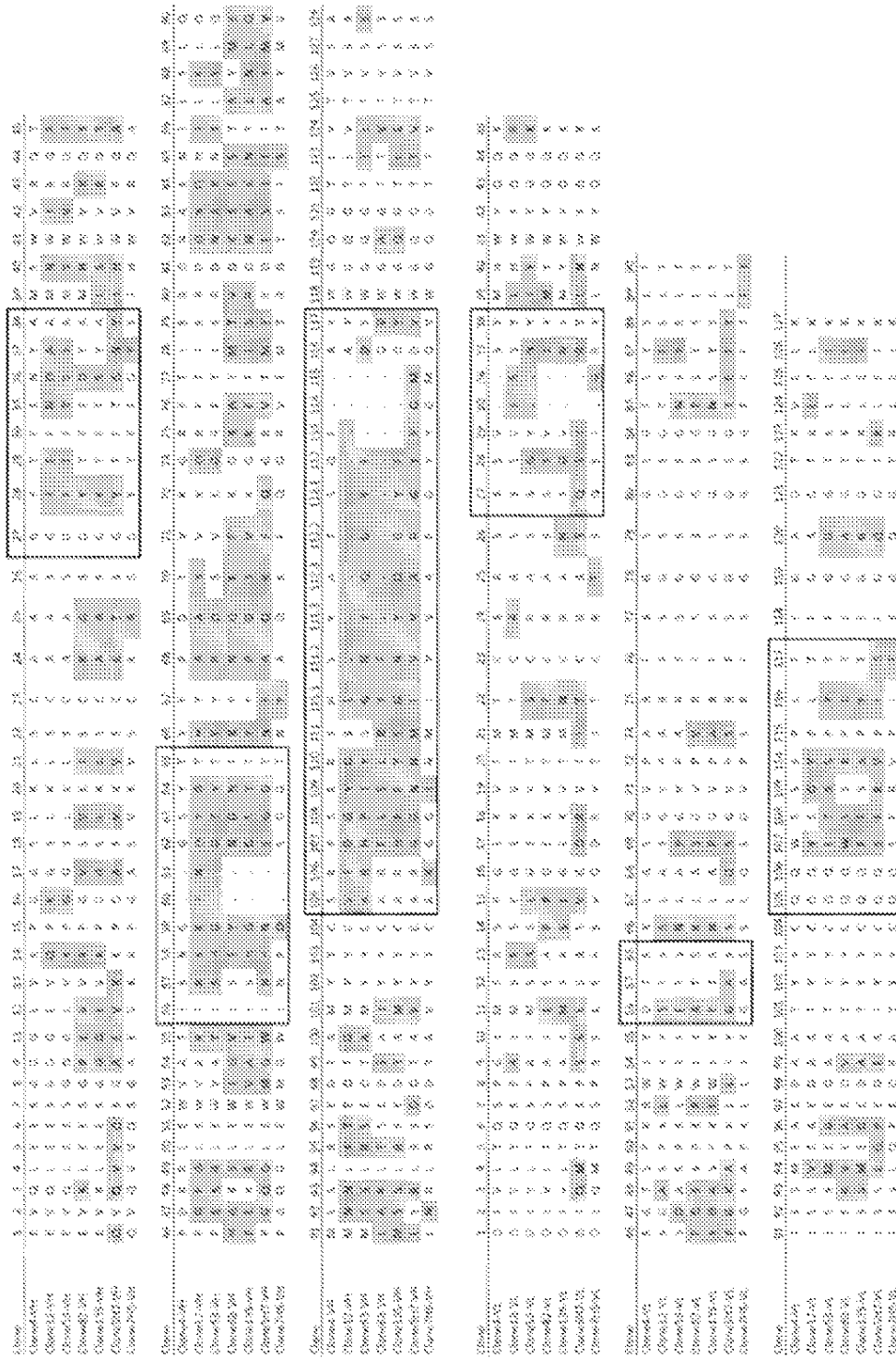


Fig. 17H



Fig. 18

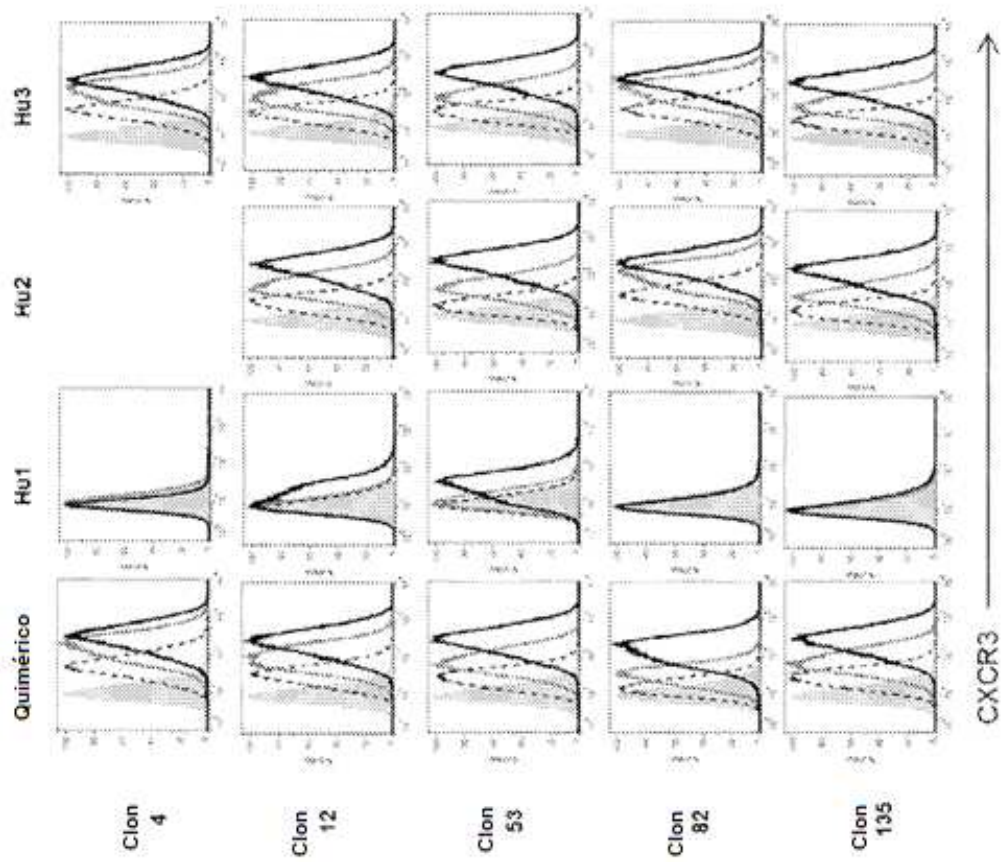


Fig. 19

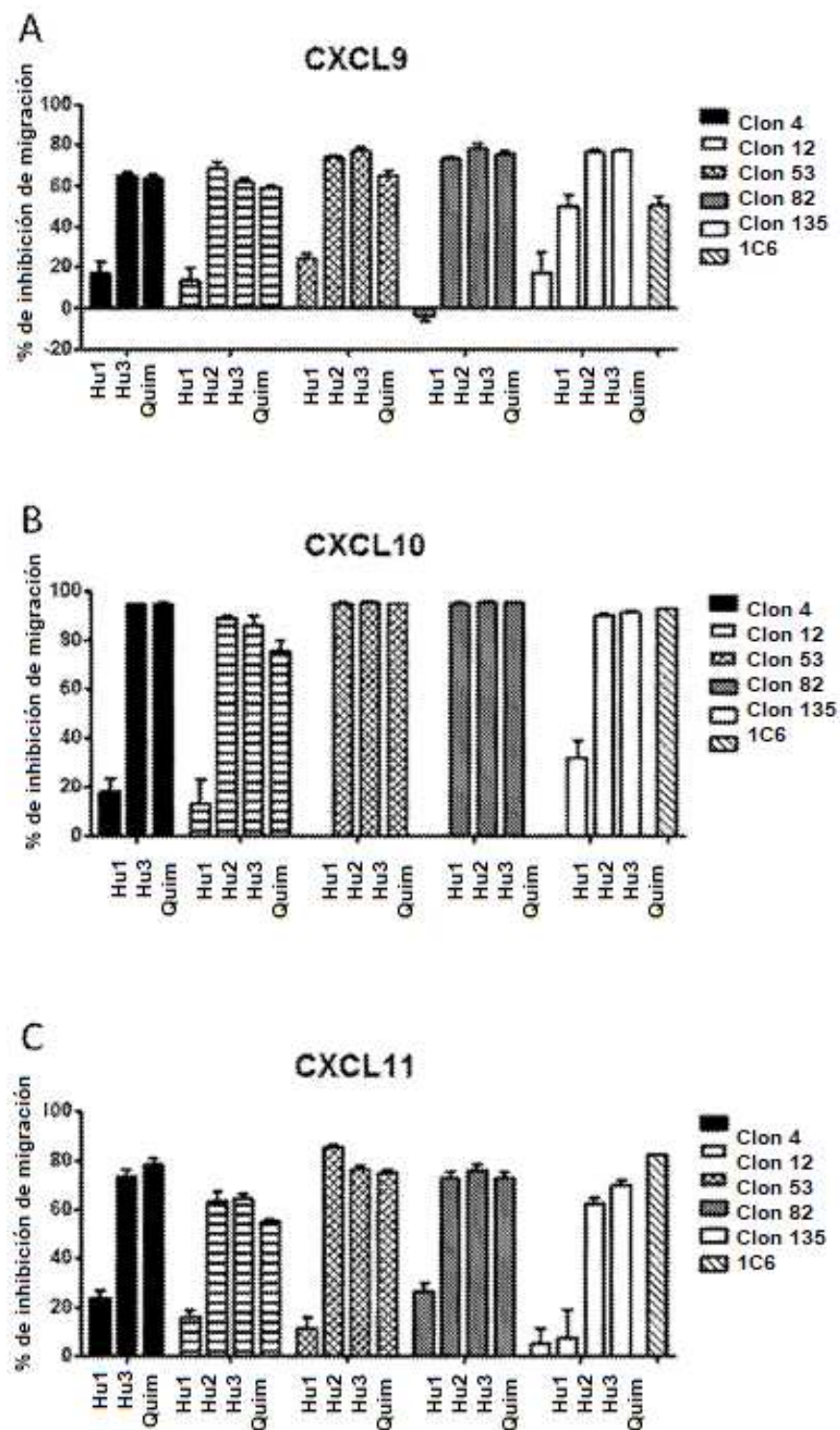


Fig. 20

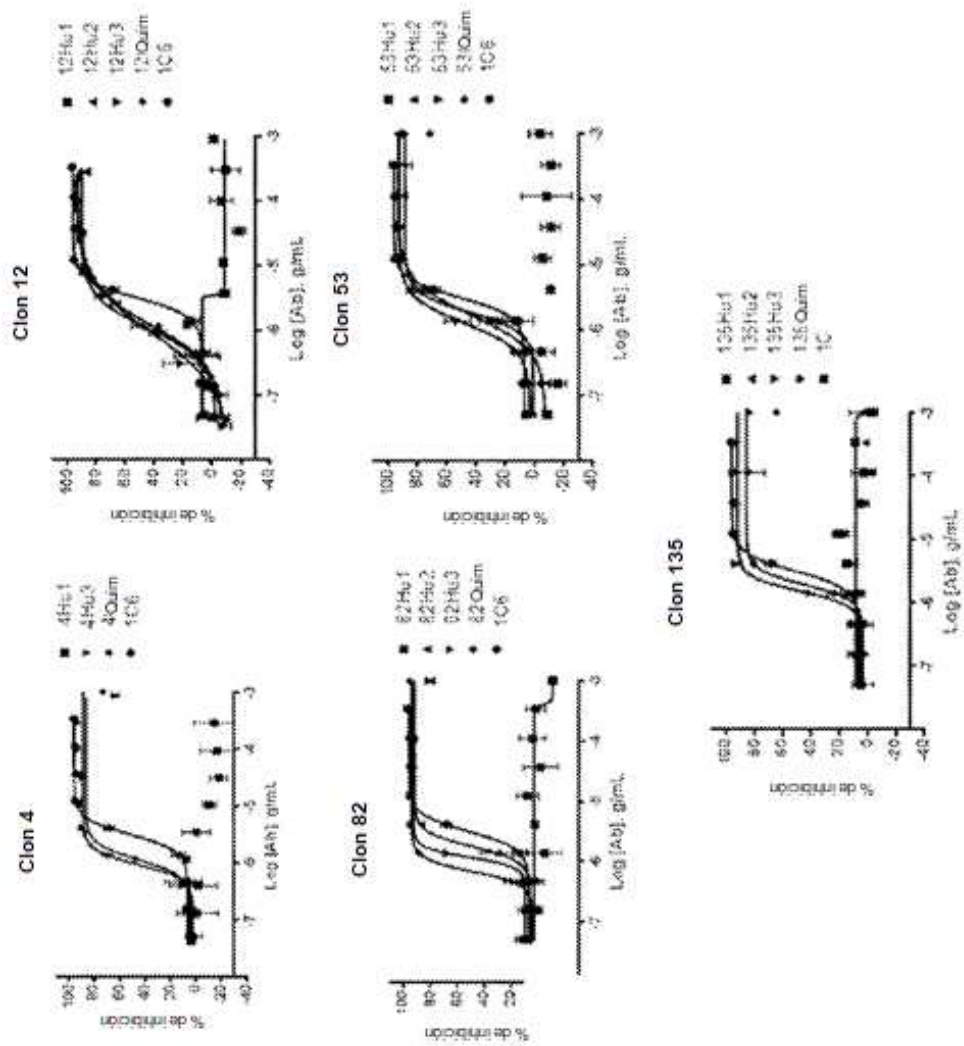


Fig. 21

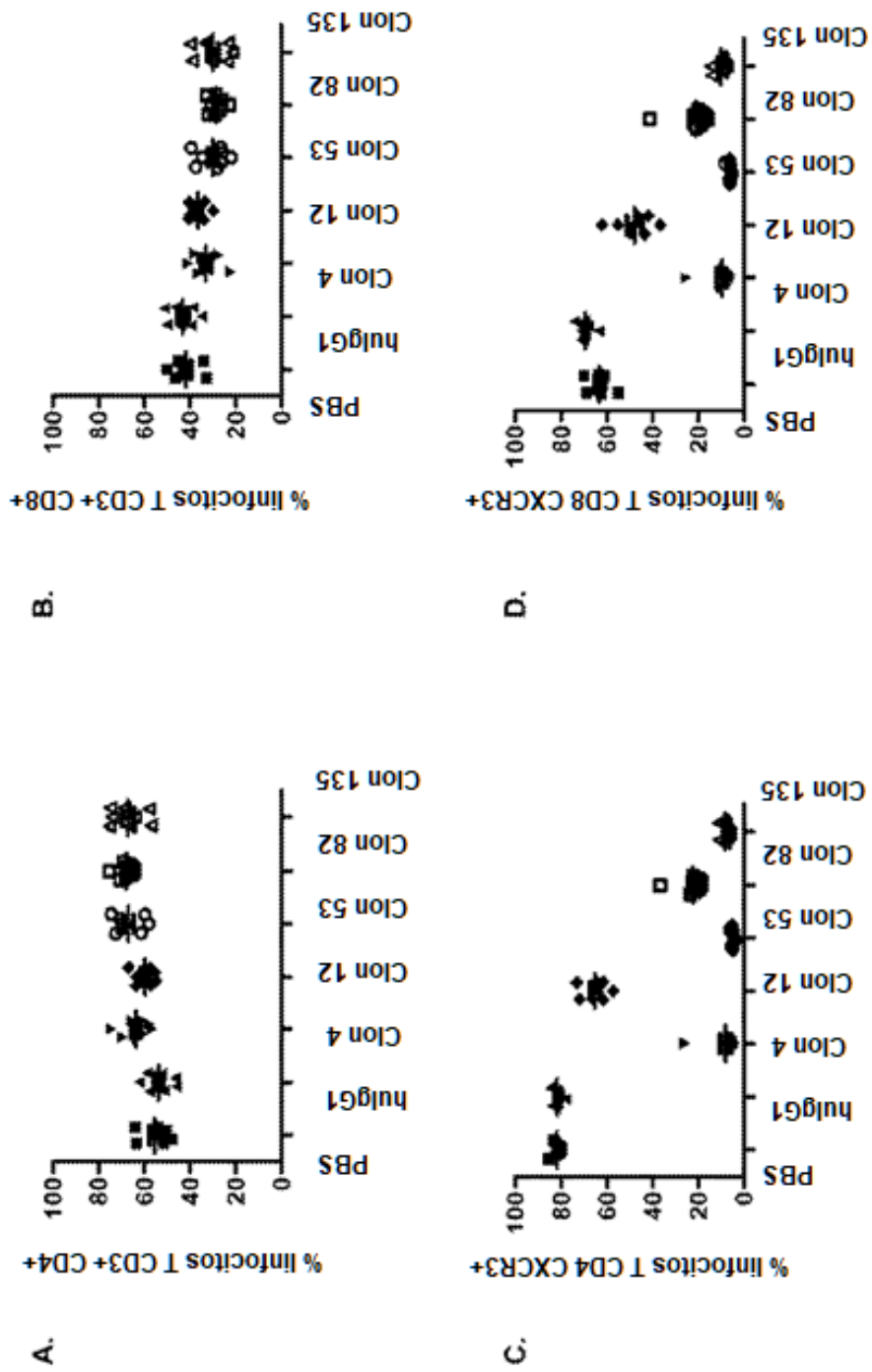


Fig. 22

Clon 12.0 - secuencia de aminoácidos de VH
- CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLEESGGGLVQPKGSLKLSKAASGISFNDAAMNWIRQAPGEGLEWVAR

          60          70          80          90          100
IRSKINDYGTHYAASVKDRFTISRDDSQNILFLQMNNLKTEDTGMYYCVI

          110
DGYGSLAYWGQGTILVTVSA (SEQ ID NO: 2)

```

Clon 12.0 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR
en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIVLTQSPAIMSSSPGKVTMTTCRASSSVISSYLHWYQQRSGASPKLWIY

          60          70          80          90          100
STSSSLASGVPARFSGSGSGTSFSLTISVVEAEDAATYYCQQYSGYPLTFG

AGTKLELK (SEQ ID NO: 3)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLEESGGGLVQPKGSLKLSKAAS
	CDR1	<u>GISFNDA</u>
	FR2	AMNWIRQAPGEGLEWVAR
	CDR2	<u>IRSKINDYGT</u>
	FR3	HYAASVKDRFTISRDDSQNILFLQMNNLKTEDTGMYYC
	CDR3	<u>VIDGYGSLAY</u>
	FR4	WGQGTILVTVSA
Cadena ligera		
	FR1	DIVLTQSPAIMSSSPGKVTMTTCRAS
	CDR1	<u>SSVISSY</u>
	FR2	LHWYQQRSGASPKLWIY
	CDR2	<u>STSS</u>
	FR3	SLASGVPARFSGSGSGTSFSLTISVVEAEDAATYYC
	CDR3	<u>QQYSGYPLT</u>
	FR4	FGAGTKLELK

Fig. 23A

Clon 12.1 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGISFNDAAMHWVRQASGKGLEWVAR

          60          70          80          90         100
IRSKINDYGTAAYAASVKGRFTISRDDSQNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVI

110
DGYGSLAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 4)

```

Clon 12.1 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVISSYLAWYQQKPGQAPRLWIY

          60          70          80          90         100
STSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCQQYSGYPLTFG

GGTKVEIK (SEQ ID NO: 5)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GISFNDAAM</u>
	FR2	MHWVRQASGKGLEWVAR
	CDR2	<u>IRSKINDYGT</u>
	FR3	AAYAASVKGRFTISRDDSQNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC
	CDR3	<u>VIDGYGSLAY</u>
	FR4	WGQGLTVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS
	CDR1	<u>SSVISSY</u>
	FR2	LAWYQQKPGQAPRLWIY
	CDR2	<u>STS</u>
	FR3	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYC
	CDR3	<u>QQYSGYPLT</u>
	FR4	FGGGTKVEIK

Fig. 23B

Clon 12.2 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en negrita y subrayadas

```

1           10           20           30           40           50
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGISFNDAAMNWIRQASGKGLEWVAR

           60           70           80           90          100
IRSKINDYGTHYAASVKGRFTISRDDSQNTLYLQMNSLKTEDTAMYYCVI

110
DGYGSLAYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

```

Clon 12.2 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en negrita y subrayadas

```

1           10           20           30           40           50
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVISSYLHWYQQKPGQAPRLWIY

           60           70           80           90          100
STSSSLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDEFTYYCQQYSGYPLTFG

```

AGTKVEIK (SEQ ID NO: 7)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GISFNDAAM</u>
	FR2	MWIRQASGKGLEWVAR
	CDR2	<u>IRSKINDYGT</u>
	FR3	HYAASVKGRFTISRDDSQNTLYLQMNSLKTEDTAMYYC
	CDR3	<u>VIDGYGSLAY</u>
	FR4	WGQGTTLVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS
	CDR1	<u>SSVISSY</u>
	FR2	LHWYQQKPGQAPRLWIY
	CDR2	<u>STS</u>
	FR3	SLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDEFTYYC
	CDR3	<u>QQYSGYPLT</u>
	FR4	EGAGTKVEIK

Fig. 23C

Clon 12.3 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGISFNDAAMNWIRQASGKGLEWVAR

          60          70          80          90         100
IRSKINDYGTHYAASVKDRFTISRDDSQNILYLQMNNLKTEDTAMYYCVI

          110
DGYGSLAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 8)

```

Clon 12.3 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR 3
en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EIVLTQSPAILSSSPGERATLSCRASSSVISSYLHWYQQKPGAAPRLWIY

          60          70          80          90         100
STSSSLASGIPARFSGSGSGTSFTLTISLSLEAEDFATYYCQQYSGYPLTFG

AGTKVEIK (SEQ ID NO: 9)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GISFNDAAM</u>
	FR2	MNWIRQASGKGLEWVAR
	CDR2	<u>IRSKINDYGT</u>
	FR3	HYAASVKDRFTISRDDSQNILYLQMNNLKTEDTAMYYC
	CDR3	<u>VIDGYGSLAY</u>
	FR4	<u>WGQGLVTVSS</u>
Cadena ligera		
	FR1	EIVLTQSPAILSSSPGERATLSCRAS
	CDR1	<u>SSVIS</u> SY
	FR2	LHWYQQKPGAAPRLWIY
	CDR2	<u>STSS</u>
	FR3	SLASGIPARFSGSGSGTSFTLTISLSLEAEDFATYYC
	CDR3	<u>QQYSGYPLT</u>
	FR4	<u>FGAGTKVEIK</u>

Fig. 23D

Clon 135.0 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVKLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFTSYALSWVRQTPEKRLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISHGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLNLMSSSLRSEDAMYYCARHP

          110         120
FYSGNYQGYFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 10)

```

Clon 135.0 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIVLTQSPAIMSASISGEKVTMNCRASGVNYMYWYQQKSDASPFLWIYFT

          60          70          80          90         100
SNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 11)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVKLEESGGGLVKPGGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	LSWVRQTPEKRLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGSYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDNANTLNLMSSSLRSEDAMYYC
	CDR3	<u>ARHPFYSGNYQGYFDY</u>
	FR4	<u>WGQGTLLTVSS</u>
Cadena ligera		
	FR1	DIVLTQSPAIMSASISGEKVTMNCRA
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	MYWYQQKSDASPFLWIY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	NLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	<u>EGGGTKLEIK</u>

Fig. 24A

Clon 135.1 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en negrita y subrayadas

```

1           10           20           30           40           50
EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVAV

           60           70           80           90          100
ISHGGSYTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHP

           110          120
FYSGNYQGYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 12)

```

Clon 135.1 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en negrita y subrayadas

```

1           10           20           30           40           50
DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCRASSGVNYLAWYQQKPGKAPKLIWYFT

           60           70           80           90          100
STLQSGVPSRFSSGSGSGNEYTLTISSLQFEDFATYYCQQFTSSPYTFGQG

TKLEIK (SEQ ID NO: 13)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAV
	CDR2	<u>ISHGGSYT</u>
	FR3	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>ARHPFYSGNYQGYFDY</u>
	FR4	WGQGTLVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	LAWYQQKPGKAPKLIWY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	TLQSGVPSRFS SGSGSGNE YTLTIS S LQFEDFATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	FGQGTKLEIK

Fig. 24B

Clon 135.2 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYALSWVRQAPGKGLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISHGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHP

          110          120
FYSGNYQGYFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 14)

```

Clon 135.2 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFSLASVGRVTITCRANSGVNYMYWYQQKPGKAPKLIWYFT

          60          70          80          90         100
SNLAPGVPSRFSGSGSGNEHTLTISSLQFEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG

TKLEIK (SEQ ID NO: 15)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	LSWVRQAPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGSYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>ARHPFYSGNYQGYFDY</u>
	FR4	WGQGTLLTVSS
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFSLASVGRVTITCRAN
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	MYWYQQKPGKAPKLIWY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	NLAPGVPSRFSGSGSGNEHTLTISSLQFEDFATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	EGGGTKLEIK

Fig. 24C

Clon 135.3 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFTSYALSWVRQTPEKRLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISHGGSYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLN LQMSSLRAEDTAVYYC ARHP

          110         120
FYSGNYQGYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 16)

```

Clon 135.3 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFELSASVGERVTITCRAN SGVNYMYWYQKPDAAFKLWIY FT

          60          70          80          90         100
SNLAPGVPSRFSGSGSGNSYTLTIS SLQFEDFATYYC QQFTSSPYTFGGG

TKLEIK (SEQ ID NO: 17)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	LSWVRQTPEKRLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGSYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLN LQMSSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>ARHPFYSGNYQGYFDY</u>
	FR4	WGQGT LVT VSS
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFELSASVGERVTITCRAN
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	MYWYQKPDAAFKLWIY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	NLAPGVPSRFSGSGSGNSYT LTIS SLQFEDFATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	EGGGTKLEIK

Fig. 24D

Clon 4.0 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1           10           20           30           40           50
EVQLEESGGGLVKGPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQTPDKRLEWVAT

           60           70           80           90          100
ISNGGSYTYYPDTVKGRFTISRDNKNTLSLQMSLRSEDATAMYYCSRPS

           110          120
ERSHYATSQFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 18)

```

Clon 4.0 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1           10           20           30           40           50
DIVLTQSPFGIMASPGGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDT

           60           70           80           90          100
SKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEREDATYYCQQWSSSPLTFGAG

TKVELK (SEQ ID NO: 19)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLEESGGGLVKGPGGSLKLSAAS
	CDR1	<u>GFTFSNYA</u>
	FR2	MSWVRQTPDKRLEWVAT
	CDR2	<u>ISNGGSYT</u>
	FR3	YYPDTVKGRFTISRDNKNTLSLQMSLRSEDATAMYYC
	CDR3	<u>SRPSERSHYATSQFAY</u>
	FR4	WGQGLTVTVSA
Cadena ligera		
	FR1	DIVLTQSPFGIMASPGGEKVTMTCSAS
	CDR1	<u>SSVSY</u>
	FR2	MHWYQQKSGTSPKRWIY
	CDR2	<u>DT</u>
	FR3	KLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEREDATYYC
	CDR3	<u>QQWSSSPLT</u>
	FR4	FGAGTKVELK

Fig. 25A

Clon 4.1 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S GFTFS N Y A M S W V R Q A P G K G L E W V A V

          60          70          80          90          100
ISNGGS Y T Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C SRPS

          110          120
ERSHY Y A T S Q F A Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO: 20)

```

Clon 4.1 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EIVLTQSPATLS L S P G E R A T L S C R A S SSVSY L A W Y Q Q K P G Q A F R R W I Y DT

          60          70          80          90          100
SNRAT G I P A R F S G S G S G T D Y T L T I S S L E P E D F A V Y Y C QQWSSSPLT F G G G

TKVEIK (SEQ ID NO: 21)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S
	CDR1	<u>GFTFS</u> N Y A
	FR2	M S W V R Q A P G K G L E W V A V
	CDR2	<u>ISNGGS</u> Y T
	FR3	Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
	CDR3	<u>SRPSE</u> R S H Y Y A T S Q F A Y
	FR4	W G Q G T L V T V S S
Cadena ligera		
	FR1	EIVLTQSPATLS L S P G E R A T L S C R A S
	CDR1	<u>SSVSY</u>
	FR2	L A W Y Q Q K P G Q A F R R W I Y
	CDR2	<u>DT</u>
	FR3	N R A T G I P A R F S G S G S G T D Y T L T I S S L E P E D F A V Y Y C
	CDR3	<u>QQWSSSPLT</u>
	FR4	E G G G T K V E I K

Fig. 25B

Clon 4.2 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFSNYAMSWVPQAPGKGLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISNGGSYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC SRPS

          110          120
ERSHYATSQFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 22)

```

Clon 4.2 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSAS SSVSYMHWYQQKPGTAPRRWIYDT

          60          70          80          90         100
SKLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYC QWSSSPLTFGAG

TKVEIK (SEQ ID NO: 23)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAAS
	CDR1	<u>GFTFSNYA</u>
	FR2	MSWVPQAPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISNGGSYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>SRPS</u> ERSHYATSQFAY
	FR4	WGQGLTVTVSS
Light Chain		
	FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSAS
	CDR1	<u>SSVSY</u>
	FR2	MHWYQQKPGTAPRRWIY
	CDR2	<u>DT</u>
	FR3	SKLASGIPARFSGSGSGTDYTLT
	CDR3	<u>QWSSSPLT</u> FGAG
	FR4	TKVEIK

Fig. 25C

Clon 4.3 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en negrita y subrayadas

```

1           10           20           30           40           50
EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVPQTPDKRLEWVAT

           60           70           80           90          100
ISNGGSYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCSRPS

           110          120
ERSHYATSQFAYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 24)

```

Clon 4.3 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en negrita y subrayadas

```

1           10           20           30           40           50
EIVLTQSPAILSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRRWIYDT

           60           70           80           90          100
SKLASGIPARFSGSGSGTSYTLTISSLEAEDFATYYCQQWSSSPLTFGAG

TKVEIK (SEQ ID NO: 25)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFSNYA</u>
	FR2	MSWVPQTPDKRLEWVAT
	CDR2	<u>ISNGGSYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>SRPSERSHYATSQFAY</u>
	FR4	WGQGT LVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	EIVLTQSPAILSLSPGERATLSCSAS
	CDR1	<u>SSVSY</u>
	FR2	MHWYQQKPGQAPRRWIY
	CDR2	<u>DT</u>
	FR3	KLASGIPARFSGSGSGTSYTLT ISSLEAEDFATYYC
	CDR3	<u>QQWSSSPLT</u>
	FR4	FGAGTKVEIK

Fig. 25D

Clon 4.4 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLVESGGGVKKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPGKGLEWVAT

          60          70          80          90          100
ISNGGSYTYYPDSFQGRFTISRDNAKSTLSLQMSSLKSEDTAMYYCSRPS

          110          120
ERSHYATSQFAYWGQCTLVTVSA (SEQ ID NO: 26)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLVESGGGVKKPGGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFSNYA</u>
	FR2	MSWVRQTPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISNGGSY</u> T
	FR3	TYYPDSFQGRFTISRDNAKSTLSLQMS <u>SLKSE</u> DTAMYYC
	CDR3	<u>ERSHYATSQFAY</u>
	FR4	WGQCTLVTVSA

Fig. 25E

Clon 4.5 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLVESGGGVKKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPGKGLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISNGGSYTYYPDSFQGRFTISRDNASTLSLQMSLKAEDTAMYYCSRPS

          110          120
ERSHYATSQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FP1	EVQLVESGGGVKKPGGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFSNYA</u>
	FR2	MSWVRQTPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISNGGSYT</u>
	FR3	YYPDSFQGRFTISRDNASTLSLQMSLKAEDTAMYYC
	CDR3	<u>SRPSERSHYATSQFAY</u>
	FR4	WGQGTLVTVSS

Fig. 25F

Clon 4.6 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLVESGGGVKKPGGSLKLSCAASGTFFSNYAMSWVRQTPGKGLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISQGGSYTYYPESFQGRFTISRDKAKSTLSLQMSLKSEDTAMYYCSRPS

          110         120
ERSHYATSQFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 28)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLVESGGGVKKPGGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GTFFSNYA</u>
	FR2	MSWVRQTPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISQGGSYT</u>
	FR3	YYPESFQGRFTISRDKAKSTLSLQMSLKSEDTAMYYC
	CDR3	<u>SRPSERSHYATSQFAY</u>
	FR4	WGQGTLVTVSA

Fig. 25G

Clon 4.7 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKLEWVAT

          60          70          80          90          100
ISQGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPS

          110          120
ERSHYATSQFAYWGQGTILVTVSS (SEQ ID NO: 29)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAAS
	CDR1	GFTFSNYA
	FR2	MSWVRQAPGKLEWVAT
	CDR2	ISQGGSY T
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC
	CDR3	SRPS ERSHYATSQFAY
	FR4	WGQGTILVTVSS

Fig. 25H

Clon 4.8 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISNLGSYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPS

          110         120
ERSHYATSQFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 30)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFSNYA</u>
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISNLGSYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>SRPSERSHYATSQFAY</u>
	FR4	WGQGTLLTVSS

Fig. 25I

Clon 4.9 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVAT

          60          70          80          90          100
ISNSGSYFYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPS

          110          120
ERSHYIATSQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 31)
  
```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFSNYA</u>
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISNSGSYF</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>SRPSERSHYIATSQFAY</u>
	FR4	WGQGTLVTVSS

Fig. 25J

Clon 4.10 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISDGGSYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPS

          110          120
ERSHYATSQFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 32)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	GFTFSNYA
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAT
	CDR2	ISDGGSYT
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLPAEDTAVYYC
	CDR3	SRPSERSHYATSQFAY
	FR4	WGQGTLLTVSS

Fig. 25K

Clon 4.11 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVAT

          60          70          80          90          100
ISNVGSYTTYFDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC SRPS

          110          120
ERSHYATSQFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 33)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAAS
	CDR1	<u>GFTFSNYA</u>
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISNVGSYT</u>
	FR3	TYFDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>SRPSERSHYATSQFAY</u>
	FR4	WGQGLTVTVSS

Fig. 25L

Clon 4.4 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIVLTQSPFGLSASVGDRTMTCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRWIYDT

          60          70          80          90          100
SKLAGVPARFSGSGSGTSTSLTISLQPEDAATYYCQQWSSSPLTFGAG
  
```

TKVELK (SEQ ID NO: 34)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIVLTQSPFGLSASVGDRTMTCSAS
	CDR1	<u>SSVSY</u>
	FR2	MHWYQQKPGTSPKRWIY
	CDR2	<u>DTS</u>
	FR3	KLASGVPARFSGSGSGTSTSLTISLQPEDAATYYC
	CDR3	<u>QQWSSSPLT</u>
	FR4	FGAGTKVELK

Fig. 25M

Clon 4.5 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRWIYDT

          60          70          80          90          100
SKLASGVPARFSGSGSGTYSLTISSLQPEDAATYYCQQWSSSPLTFGAG

```

TKVEIK (SEQ ID NO: 35)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCSAS
	CDR1	<u>SSVSY</u>
	FR2	MHWYQQKPGTSPKRWIY
	CDR2	<u>DPS</u>
	FR3	KLASGVPARFSGSGSGTYSLTIS <u>SLQ</u> PEDAATYYC
	CDR3	<u>QQWSSSPLT</u>
	FR4	FGAGTKVEIK

Fig. 25N

Clon 4.6 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMHWYQQKPGQSPKRWIYDT

          60          70          80          90          100
SKLASGVPARFSGSGSGTYSLTISSLQPEDAATYYCQQWSSSPLTFGAG

```

TKVEIK (SEQ ID NO: 36)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSAS
	CDR1	<u>SSVSY</u>
	FR2	MHWYQQKPGQSPKRWIY
	CDR2	<u>DTS</u>
	FR3	KLASGVPARFSGSGSGTYSLTIS <u>SLQ</u> PEDAATYYC
	CDR3	<u>QQWSSSPLT</u>
	FR4	FGAGTKVEIK

Fig. 25O

Clon 4.7 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPGSLASVGDRTMTCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPKRWIYDT

          60          70          80          90          100
SKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSLQPEDAATYYCQQWSSSPLTFGAG

```

TKVELK (SEQ ID NO: 37)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPGSLASVGDRTMTCSAS
	CDR1	<u>SSVSY</u>
	FR2	MHWYQQKPGTSPKRWIY
	CDR2	<u>DT</u>
	FR3	KLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSLQPEDAATYYC
	CDR3	<u>QQWSSSPLT</u>
	FR4	FGAGTKVELK

Fig. 25P

Clon 53.0 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLEESGGGLVKGPGGSLKLSCAASGFTFTSYAMSWVRQTPEKRLEWVAT

          60          70          80          90          100
ISHGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHP

          110          120
IYSGNYQGYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 38)

```

Clon 53.0 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIVLTQSPAISASLGEKVTMSCRASSGVNYIYWYQQKSDASPRLNIYFT

          60          70          80          90          100
SNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGG

TKLEIK (SEQ ID NO: 39)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLEESGGGLVKGPGGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	MSWVRQTPEKRLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGTYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDAMYYC
	CDR3	<u>ARHP</u> IYSGNYQGYFDY
	FR4	<u>WGQGTTLTVSS</u>
Cadena ligera		
	FR1	DIVLTQSPAISASLGEKVTMSCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQQKSDASPRLNIY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	SNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	<u>FGGGTKLEIK</u>

Fig. 26A

Clon 53.1 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S GFTFTSYA M S W V R Q A P G K G L E W V A V

          60          70          80          90          100
ISHGGTYT Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C ARHP

          110          120
IYSGNYQGYFDY W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO: 40)

```

Clon 53.1 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPS F L S A S V G D R V T I T C R A S SGVNY L A W Y Q Q K F G K A P K L W I Y FT

          60          70          80          90          100
STLQSGVPSRFSGSGSGNE Y T L T I S S I Q P E D F A T Y Y C QQFTSSPYT F G Q G

TKLEIK (SEQ ID NO: 41)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	M S W V R Q A P G K G L E W V A V
	CDR2	<u>ISHGGTYT</u>
	FR3	Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
	CDR3	<u>ARHP</u> I Y S G N Y Q G Y F D Y
	FR4	W G Q G T L V T V S S
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPS F L S A S V G D R V T I T C R A S
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	L A W Y Q Q K F G K A P K L W I Y
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	T L Q S G V P S R F S G S G S G N E Y T L T I S S I Q P E D F A T Y Y C
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	F G Q G T K L E I K

Fig. 26B

Clon 53.2 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISRGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHP

          110         120
IYSGNYQGYFDYWGQGTILVTVSS (SEQ ID NO: 42)

```

Clon 53.2 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASSGVNYIYWYQKPGKAPKLWIYFT

          60          70          80          90         100
SNLAPGVPSRFSGSGSGNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG

TKLEIK (SEQ ID NO: 43)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAAS
	CDR1	GFTFTSYA
	FR2	MSWVRQAPGKLEWVAT
	CDR2	ISRGGTYT
	FR3	YYPD SVKGRFTISR DN AKNTLYLQMN SLRAEDTAMYYC
	CDR3	ARHP IYSGNYQGYFDY
	FR4	WGQGTILVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS
	CDR1	SGVNY
	FR2	IYWYQKPGKAPKLWIY
	CDR2	FTS
	FR3	NLAPGVPSRFSGSGSGNE YTLTIS SLQPEDFATYYC
	CDR3	QQFTSSPYT
	FR4	EGGGTKLEIK

Fig. 26C

Clon 53.3 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQTPEKRLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISHGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHP

          110         120
IYSGNYQGYFDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 44)

```

Clon 53.3 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRASSGVNYIYWYQQKPDAAFKLWIYFT

          60          70          80          90         100
SNLAPGVPSRFSGSGSGNSYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG

TKLEIK (SEQ ID NO: 45)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	MSWVRQTPEKRLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGTYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYC
	CDR3	<u>ARHP</u> IYSGNYQGYFDY
	FR4	WGQGTITVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQQKPDAAFKLWEY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	NLAPGVPSRFSGSGSGNSYTLTISSLQPEDFATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	EGGGTKLEIK

Fig. 26D

Clon 53.4 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVAV

          60          70          80          90         100
ISHGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHP

          110         120
IYSGNYQGYFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 46)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAV
	CDR2	<u>ISHGGTYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYC
	CDR3	<u>ARHP</u> IYSGNYQGYFDY
	FR4	WGQGTLLTVSS

Fig. 26E

Clon 53.5 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISHGGTYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHP

          110          120
IYSGNYQGYFDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 47)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGTYT</u>
	FR3	YYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYC
	CDR3	<u>ARHP</u> IYSGNYQGYFDY
	FR4	WGQGTLLVTVSS

Fig. 26F

Clon 53.6 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1      10      20      30      40      50
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVAT

      60      70      80      90     100
ISHGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHP

      110     120
IYSGNYQGYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 48)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGTYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>ARHP</u> <u>IYSGNYQGYFDY</u>
	FR4	WGQGLTVTVSS

Fig. 26G

Clon 53.4 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRASSGVNYLYWYQQKPGKAPKRWIYFT

          60          70          80          90         100
SNLAPGVPSRFSGSGSGNEYTLTISLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 49)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRAS
	CDR1	SGVNY
	FR2	LYWYQQKPGKAPKRWIY
	CDR2	FPS
	FR3	NLAPGVPSRFSGSGSGNEYTLTISLQPEDFATYYC
	CDR3	QQFTSSPYT
	FR4	FGGGTKLEIK

Fig. 26H

Clon 53.5 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1      10      20      30      40      50
DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRASSGVNYIAWYQQKPGKAPKLWIYFT

      60      70      80      90     100
SNLAPGVPSRFSGSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 50)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IAWYQQKPGKAPKLWIY
	CDR2	<u>FT</u>
	FR3	SNLAPGVPSRFSGSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	FGGGTKLEIK

Fig. 26I

Clon 53.6 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRASSGVNYIYWYQQKPGKAPKRWIYFT

          60          70          80          90          100
STLAPGVPSRFSGSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 51)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQQKPGKAPKRWIY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	TLAPGVPSRFSGSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	FGGGTKLEIK

Fig. 26J

Clon 53.7 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRASSGVNYIYWYQQKPGKAPKRWIYFT

          60          70          80          90          100
SNLQPGVPSRFSGSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTTFGGG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 52)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFSLASVGDRTITCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQQKPGKAPKRWIY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	NLQPGVPSRFSGSGSGSNEYTLTIS <u>SLQ</u> PEDFATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	EGGGTKLEIK

Fig. 26K

Clon 53.8 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASSGVNYIYWYQQKPGKAPKLIYFT

          60          70          80          90          100
SNLASGVPSRFSGSGSGNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 53)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQQKPGKAPKLIY
	CDR2	<u>FT</u>
	FR3	NLASGVPSRFSGSGSGNEYTLTISSLQPEDFATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPY</u>
	FR4	FGGGTKLEIK

Fig. 26L

Clon 53.9 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1      10      20      30      40      50
DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCRASSGVNYIYWYQOKPGKAPKLWIYFT

      60      70      80      90     100
SNLAPGVPSRFSGSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGQG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 54)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQOKPGKAPKLWIY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	NLAPGVPSRFSGSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	FGQGTKLEIK

Fig. 26M

Clon 53.7 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSYAMSWVRQTPGKRLEWVAT

          60          70          80          90          100
ISHGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMS SLRSEDTAMYYCARHP

          110          120
IYSGNYQGYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 63)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	MSWVRQTPGKRLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGTYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMS SLRSEDTAMYYC
	CDR3	<u>ARHP</u> IYSGNYQGYFDY
	FR4	WGQGTTLTVSS

Fig. 26N

Clon 53.8 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISHGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARHP

          110          120
IYSGNYQGYFDYWGQGTLTVVSS (SEQ ID NO: 64)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLKLS CAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGTYT</u>
	FR3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYC
	CDR3	<u>ARHP</u> <u>IYSGNYQGYFDY</u>
	FR4	WGQGT LTV VSS

Fig. 260

Clon 53.9 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESQGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSYAMSWVRQTPGKRLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISHGGTYTYYPESVKGRFTISRQSKNTLYLQMSSLRSEDVAVYYCARHP

          110          120
IYSGNYQGYFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 65)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLKLSCAAS
	CDR1	<u>GFTFTSYA</u>
	FR2	MSWVRQTPGKRLEWVAT
	CDR2	<u>ISHGGTYT</u>
	FR3	YYPESVKGRFTISRQSKNTLYLQMSSLRSEDVAVYYC
	CDR3	<u>ARHP</u> IYSGNYQGYFDY
	FR4	WGQGTTTLTVSS

Fig. 26P

Clon 53.10 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
EVQLLESQGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVAT

          60          70          80          90         100
ISHGGTYTYYPESVKGRFTISRDSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARHP

          110         120
IYSGNYQGYFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 66)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLKLSCAAS
	CDR1	GFTFTSYA
	FR2	MSWVRQAPGKGLEWVAT
	CDR2	ISHGGTYT
	FR3	YYPESVKGRFTISRDSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYC
	CDR3	ARHP IYSGNYQGYFDY
	FR4	WGQGTLLTVSS

Fig. 26Q

Clon 53.10 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPAIMSASVGDRTVMSCRASSGVNYIYWYQQKPGASPKLWIYFT

          60          70          80          90          100
SNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMQGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGG
  
```

TKLEIK (SEQ ID NO: 67)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPAIMSASVGDRTVMSCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQQKPGASPKLWIY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	NLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMQGEDAATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	EGGGTKLEIK

Fig. 26R

Clon 53.11 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPAILSASVGDRVTISCRASSGVNYIYWYQQKPGQSEFKLWIYFT

          60          70          80          90         100
SNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMQGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 68)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPAILSASVGDRVTISCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQQKPGQSEFKLWIY
	CDR2	<u>FT</u>
	FR3	<u>SN</u> LAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMQGEDAATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	FGGGTKLEIK

Fig. 26S

Clon 53.12 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPAILSASVGDRVTMSCRASSGVNYIYWYQOKPGASEFKLWIYFT

          60          70          80          90         100
SNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMQGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 69)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPAILSASVGDRVTMSCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQOKPGASEFKLWIY
	CDR2	<u>FT</u>
	FR3	SNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMQGEDAATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	FGGGTKLEIK

Fig. 26T

Clon 53.13 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1      10      20      30      40      50
DIQLTQSPAILSASVGDRVTISCRASSGVNYIYWYQQKPGQSPKRWIYFT

      60      70      80      90     100
SNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMQGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGG

```

TKLEIK (SEQ ID NO: 70)

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPAILSASVGDRVTISCRAS
	CDR1	<u>SGVNY</u>
	FR2	IYWYQQKPGQSPKRWIY
	CDR2	<u>FTS</u>
	FR3	NLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMQGEDAATYYC
	CDR3	<u>QQFTSSPYT</u>
	FR4	EGGGTKLEIK

Fig. 26U

Clon 82.0 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1         10        20        30        40        50
EVKLEESGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGV

        60        70        80        90       100
ISTYNGNTKYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCAREFL

        110
SLRYFDVWGAGTTTVTVSS    (SEQ ID NO: 55)

```

Clon 82.0 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1         10        20        30        40        50
DIVLTQSPAILSAPPGEKVTMTTCRASSSVIYMYWYQQKPGSSPKPWIYAT

        60        70        80        90       100
SKLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEADVATYYCQWSSEPLTFGAG

TKLELK    (SEQ ID NO: 56)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	EVKLEESGPEVVRPGVSVKISCKGS
	CDR1	<u>GYTFTDYA</u>
	FR2	MHWVKQSHAKSLEWIGV
	CDR2	<u>ISTYNGNT</u>
	FR3	KYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYC
	CDR3	<u>AREFLSLRYFDV</u>
	FR4	WGAGTTTVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	DIVLTQSPAILSAPPGEKVTMTTCRAS
	CDR1	<u>SSVIY</u>
	FR2	MYWYQQKPGSSPKPWIY
	CDR2	<u>ATS</u>
	FR3	KLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEADVATYYC
	CDR3	<u>QWSSEPLT</u>
	FR4	FGAGTKLELK

Fig. 27A

Clon 82.1 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
QVKLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLENIGW

          60          70          80          90         100
ISTYNGNTKYSQKFQGRATMTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFL

          110
SLRYFDVWGKGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 57)

```

Clon 82.1 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFSLASVGDRTTITCRASSSVIYLAWYQQKPGKAPKFWIYAT

          60          70          80          90         100
STLQSGVPSRFSSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSEPLTFGGG

TKVEIK (SEQ ID NO: 58)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	QVKLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS
	CDR1	<u>GYTFTDYA</u>
	FR2	MHWVRQAPGQRLENIGW
	CDR2	<u>ISTYNGNT</u>
	FR3	KYSQKFQGRATMTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC
	CDR3	<u>ARFL</u> SLRYFDV
	FR4	WGKGTTTVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFSLASVGDRTTITCRAS
	CDR1	<u>SSVIY</u>
	FR2	LAWYQQKPGKAPKFWIY
	CDR2	<u>ATS</u>
	FR3	STLQSGVPSRFS <u>SGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC</u>
	CDR3	<u>QQWSSEPLT</u>
	FR4	FGGGTKVEIK

Fig. 27B

Clon 82.2 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en negrita y subrayadas

```

1         10         20         30         40         50
QVKLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKGSGYTFTDYAMHWVPQAPGQRLEWIGV

        60        70        80        90       100
ISTYNGNTKYNQKFQGRATMTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAIYYCARFL

        110
SLRYFDVWGAGTTTVTVSS    (SEQ ID NO: 59)

```

Clon 82.2 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en negrita y subrayadas

```

1         10         20         30         40         50
DIQLTQSPSFSLASVGDRTTITCRASSSVIYMYWYQQKPGKAPKFWIYAT

        60        70        80        90       100
SKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSEPLTFGAG

        110
TKVEIK    (SEQ ID NO: 60)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	QVKLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKGS
	CDR1	<u>GYTFTDYA</u>
	FR2	MHWVPQAPGQRLEWIGV
	CDR2	<u>ISTYNGNT</u>
	FR3	KYNQKFQGRATMTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAIYYC
	CDR3	<u>ARFLSLRYFDV</u>
	FR4	WGAGTTTVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFSLASVGDRTTITCRAS
	CDR1	<u>SSVIY</u>
	FR2	MYWYQQKPGKAPKFWIY
	CDR2	<u>ATS</u>
	FR3	KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC
	CDR3	<u>QQWSSEPLT</u>
	FR4	FGAGTKVEIK

Fig. 27C

Clon 82.3 - secuencia de aminoácidos de VH - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
QVKLVQSGPEVKVPGASVKVSCCKGSGYTFTDYAMHWVRQAPGQSLEWIGV

          60          70          80          90          100
ISTYNGNTKYNQKFQGRATMTVDKSASTAYMELSRRLRSEDTAIYYCAREL

          110
SLRYFDVWGAGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 61)

```

Clon 82.3 - secuencia de aminoácidos de VL - CDR en
negrita y subrayadas

```

1          10          20          30          40          50
DIQLTQSPSFELSASPGDRVITITCRASSSVIYMYWYQQKPGSAPKFWIYAT

          60          70          80          90          100
SKLASGVPVRFSGSGSGTSYTLTISRLQAEDFATYYCQQWSSEPLTFGAG

          110
TKVEIK (SEQ ID NO: 62)

```

SEQ ID NO	Región	Secuencia
Cadena pesada		
	FR1	QVKLVQSGPEVKVPGASVKVSCCKGS
	CDR1	<u>GYTFTDYA</u>
	FR2	MHWVRQAPGQSLEWIGV
	CDR2	<u>ISTYNGNT</u>
	FR3	KYNQKFQGRATMTVDKSASTAYMELSRRLRSEDTAIYYC
	CDR3	<u>ARELSLRYFDV</u>
	FR4	WGAGTTTVTVSS
Cadena ligera		
	FR1	DIQLTQSPSFELSASPGDRVITITCRAS
	CDR1	<u>SSVIY</u>
	FR2	MYWYQQKPGSAPKFWIY
	CDR2	<u>ATS</u>
	FR3	KLASGVPVRFSGSGSGTSYTLTISRLQAEDFATYYC
	CDR3	<u>QQWSSEPLT</u>
	FR4	FGAGTKVEIK

Fig. 27D

SEQ ID NO	Anticuer DO	Secuencia
	12.0 VH	5'GAGGTGCAGCTGGAAGAGTCCGGCGGAGGCTTGGTSCAGCCCAAG GSCAGCCTGAAGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCATCAGCTTCAACGA CGCCGCCATGAACTGGATCCGGCAGGCCCTGGCGAGGGCCTGGAAT GGGTGGCCCGGATCAGAAGCAAGATCAACGACTACGGCACCCACTAC GCCGCCAGCGTGAAGGACCGGTTTACCATCAGCCGGGACGACAGCCA GAATATCCTGTTCTCTGCAGATGAACAACCTGAAAACCGAGGACACCG GCATGTACTACTGCGTGATCGACGGCTACGGCAGCCTGGCCTACTGG GGCCAGGGAACCCCTGGTGACAGTGTCCGCC3'
	12.0 VL	5'GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCGCCATCATGAGCAGCAGCCCT GGCGAGAAAGTGACCATGACCTGCCGGGCCAGCAGCAGCGTGATCAG CAGCTACCTGCAGTGGTATCAGCAGCGGAGCGGGCGCCAGCCCCAAGC TGTGGATCTACAGCACCAGCAGCCTGGCCAGCGGCGTGCCAGCCAGA TTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCCAATCTCTCAGCCTGACCATCAGCAG CGTGGAAGCCGAGGACGCCGCCAATCTACTGTCAGCAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTCGGAGCCGGCACCAAGCTGGARCTGAAG3'
	12.1 VH	5'GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGC GGCAGCCTGAAGCTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCATCAGCTTCAACGA CGCCGCCATGCAGTGGGTGCCCCAGGCCCTTGGCAAGGGCCTGGAAT GGGTGGCCCGGATCAGAAGCAAGATCAACGACTACGGCACCCGCTAC GCCGCCAGCGTGAAGGCGAGATTACCATCAGCCGGGACGACAGCCA GAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCG CCGTGTACTACTGCGTGATCGACGGCTACGGCAGCCTGGCCTACTGG GGCCAGGGAACCCCTGGTGACAGTGTCCAGC3'
	12.1 VL	5'GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCGCCACCTGTCTCTGAGCCCT GGCGAGAGAGCCACCTGAGCTGCAGAGCCAGCAGCAGCGTGATCAG CAGCTACCTGGCCTGGTNTCAGCAGAGGCCCGGCCAGGCCCCAGAC TGTGGATCTACAGCACCAGCAACCGGGCCACCGGCATCCCCGCCAGA TTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCCACCGACTTCAACCTGACCATCAGCAG CCTGGAACCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAATCAAG3'

Fig. 28A

SEQ ID NO	Anticuerpo	Secuencia
	12.2 VH	5'GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGGGAGGACTGGTGCAGCCTGGC GGCAGCCTGAAGCTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCATCAGCTTCAACGA CGCCGCCATGAACTGGATCCGGCAGGCCAGCGGCAAGGGCCTGGAAT GGGTGGCCCCGGATCAGAAGCAAGATCAACGACTACGGCACCCTACTAC GCCGCCAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCCA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCG CCATGTACTACTGCGTGATCGACGGCTACGGGACGCCTGGCCTACTGG GGCCAGGGAACCCCTGGTGACAGTGTCCAGC3'
	12.2 VL	5'GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCCACCCCTGTCTCTGAGCCCT GGCGAGAGAGCCACCCCTGAGCTGCAGAGCCAGCAGCAGCGTGATCAG CAGCTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGAC TGTGGATCTACAGCACCAGCAGCCTGGCCAGCGGCATCCCCGCCAGA TTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTC CCTGGAAACCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTCGGAGCCCGGCACCAAGGTGGAAATCAAG3'
	12.3 VH	5'GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGGGAGGCTGGTGCAGCCCAAG GGCAGCCTGAAGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCATCAGCTTCAACGA CGCCGCCATGAACTGGATCCGGCAGGCCAGCGGCAAGGGCCTGGAAT GGGTGGCCCCGGATCAGAAGCAAGATCAACGACTACGGCACCCTACTAC GCCGCCAGCGTGAAGGACCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCCA GAACATCCTGTACCTGCAGATGAACAACCTGAAAACCGAGGACACCG CCATGTACTACTGCGTGATCGACGGCTACGGGACGCCTGGCCTACTGG GGCCAGGGAACCCCTGGTGACAGTGTCCAGC3'
	12.3 VL	5'GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCCATCCTGAGCAGCTCTCCA GGCGAGAGAGCCACCCCTGAGCTGCAGAGCCAGCAGCAGCGTGATCAG CAGCTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCGCCGCTCCCCGGC TGTGGATCTACAGCACAAGCAGCCTGGCCAGCGGCATCCCCGCCAGA TTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCAG CCTGGAAAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTCGGAGCCCGGCACCAAGGTGGAAATCAAG3'

Fig. 28B

SEQ ID NO	Anticuerpo	Secuencia
	135.0 VH	5'GAAGTGAAGCTGGAAGAGTCCGGCGGAGGCGCTGGTGAABCCCTGGCGGGCA GCCTGAAGCTGAGCTGCGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCC TGAGCTGGGTGCGCCAGACCCCCGAGAAGAGACTGGAATGGGTGGCCACCA TCAGCCACGGCGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCAGAGACAACGCCAAGAACACCCCTGAACCTGCAGATGAGCA GCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGCCAGGCACCCCTTCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGC TGACCGTGTCTCT3'
	135.0 VL	5'GACATCGTGTGACCCAGAGCCCCGCCATCATGAGCGCCAGCGCTGGGCG AGAAAGTGACCATGAACCTGCCGGGCCAACAGCGGCGTGAACCTACATGTACT GGTATCAGCAGAAGTCCGACGCCAGCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCCTGGCGTGCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACAGCTACAGCCTGAACATCAGCAGCATGGAAGGCGAGGACGCCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTCAACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'
	135.1 VH	5'GAGGTGCAGCTGGAAGAGTCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCGCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGAGACTGGAATGGGTGGCGTGA TCAGCCACGGCGGCAGCTACACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACACACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGGCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCAGACACCCCTTCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC3'
	135.1 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTGCGGGCCAGCAGCGGCGTGAACCTACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCACCCCTGCAGAGCGGCGTGCCCGCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGTTCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTCAACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'

Fig. 28C

SEQ ID NO	Anticuer DO	Secuencia
	135.2 VH	5'GAGGTGCAGCTGGAAGAGTCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCCC TSAGCTGGGTGGCCCAAGCCCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGGCCACCA TCAGCCACGGCGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCAGAGACAAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGACCA GCCTGGCGGGCCGAGGACACCGCCCGTGTACTACTGCGCCAGACACCCCTTCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC3'
	135.2 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCACAGCGGGCGTGAACCTACATGTACT GGTATCAGCAGAGGCGCGGCAAGGGCCCCCARGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCCCCTGGCGTGGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGTTCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCCACCA AGCTGGAAATCAAG3'
	135.3 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTGGAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCCC TSAGCTGGGTGGCCAGACCCCCGAGAAGAGAGACTGGAATGGGTGGCCACCA TCAGCCACGGCGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCAGAGACAAACAGCAAGAACACCCCTGAACCTGCAGATGACCA GCCTGGCGGGCCGAGGACACCGCCCGTGTACTACTGCGCCAGGCACCCCTTCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC3'
	135.3 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCACAGCGGGCGTGAACCTACATGTACT GGTATCAGCAGAGGCGCGGCAAGGGCCCCCARGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCCCCTGGCGTGGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACAGCTACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGTTCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCCACCA AGCTGGAAATCAAG3'

Fig. 28D

SEQ ID NO	Anticuer no	Secuencia
	4.0 VH	5'GAAGTGCAGCTGAGAGGAGTCAGGGGGAGGCTTATGAAAGCCTGGAGGGT CCCTAAAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTTCAGTTTCAGTAATTAATGCCA TGTCTTGGGTTCCCCAGACTCCCGATAAGGGGCTGGAGTGGGTGSCAACCA TTAGTAATGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGTCGCT TCACCATCTCCAGAGACAAATGCCAAGBACACCCCTGTCTCTGCAAAATGAGCA GTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTTCAAGACCCCTCTGAGA GATCCCATTACTACGCTACTAGCCAGTTTGCTTACTG GGGCCAAGGACCTCTGGTCACTGTCTCTGCA3'
	4.0 VL	5'GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCAGGAATCATGTCTGCATCTCCAGGGG AGAAAGTCACCATGACCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAGTTTACATGCATT GGTACCAGCAGAAGTCAAGGCACTTCCCCAAAAGATGGATTATGACACAT CCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGA CCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTT ATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAGCCCCGCTCACGTTCCGTTGCTGGGACCA AGGTGGAGCTGAAA3'
	4.1 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCTGGCGAGGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCA TGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCTTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCCGTGA TCAGCAACGGCGGCAGCTACAUCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCT TCACCATCAGCCGGGACAAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGARCA GCCTGGCGGGCCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCAGCCGGGCCAGCGASC GGAGCCACTACTACGCCACCCAGCCAGTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC3'
	4.1 VL	5'GAGATCGTGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCCTGTCTCTGAGCCCTGGCG AGAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCAGCAGCGTGTCTTACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCAGACGGTGGATCTACGACACCA GCAACCGGGCCACCGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA CCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAAACCCGAGGACTTCGCCGTGT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAGCCCCCTGACCTTTCGGCGGAGGCAACCA AGGTGGAAATCAAG3'

Fig. 28E

SEQ ID NO	Anticuer po	Secuencia
	4.2 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTTCGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCA TGAAGCTGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGGTGGCCACCA TCAGCAACGGCGGCGAGCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAAACAGCAAGAACAACCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGCGGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCAGCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTTGGCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC3'
	4.2 VL	5'GAGATCGTGTGACCCAGAGGCCCCGCCACCTGTCTCTGAGCCTGGCG AGAGAGCCACCTTGAGCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCTTACATGCAGT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCACCGCCCCAGACGGTGGATCTACGATACCA GCAAGCTGGCCAGCGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA CCGACTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAGCCCCCTGACCTTCGGAGCCGGCACCA AGGTGGAAATCAAG3'
	4.3 VH	5'GAGGTGCAGCTGGAAAGAGTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTTCGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCA TGAAGCTGGGTGCGCCAGGCCCCCGACAAGCGGCTGGAAATGGGTGGCCACCA TCAGCAACGGCGGCGAGCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAAACAGCAAGAACAACCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGCGGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCAGCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTTGGCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC3'
	4.3 VL	5'GAGATCGTGTGACCCAGAGGCCCCGCCATCCTGAGCCTGTCTCCAGGCG AGAGAGCCACCTTGAGCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCTTACATGCAGT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCACCGCCCCAGACGGTGGATCTACGATACCA GCAAGCTGGCCAGCGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA CCAGCTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGGAAGCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAGCCCCCTGACCTTCGGAGCCGGCACCA AGGTGGAAATCAAG3'

Fig. 28F

SEQ ID No	Anticuer no	Secuencia
	4.4 VH	5'GAGGTTCAGCTGGTGTGAAAGCGGCGGAGGCGTGAAGAAGCCTGGCGGCA GCCTGAAGCTGAGCTGTGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTAAGCCA TGACCTGGGTCCGACAGACCCCCCGGCAAGGGGCTGGAAATGGGTGGGCACCA TCAGCAACGGCGGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCTTCCAGGGCGGGT TCACCATCAGCGGGGACAAACGCCAAGAGCACCCCTGAGGCTGCAGATGTCCA GCCTGAAGTCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCAGCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTTCGGCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTGTCT3'
	4.5 VH	5'GAGGTTCAGCTGGTGTGAAAGCGGCGGAGGCGTGAAGAAGCCTGGCGGCA GCCTGAAGCTGAGCTGTGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTAAGCCA TGAGCTGGGTCCGACAGACCCCCCGGCAAGGGGCTGGAAATGGGTGGGCACCA TCAGCAACGGCGGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCTTCCAGGGCGGGT TCACCATCAGCGGGGACAAACGCCAAGAGCACCCCTGAGGCTGCAGATGTCCA GCCTGAAGGCGGAGGACACCGCCATGTACTACTGCAGCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTTCGGCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTGTCT3'
	4.6 VH	5'GAGGTTCAGCTGGTGTGAAAGCGGCGGAGGCGTGAAGAAGCCTGGCGGCA GCCTGAAGCTGAGCTGTGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTAAGCCA TGAGCTGGGTCCGACAGACCCCCCGGCAAGGGGCTGGAAATGGGTGGGCACAA TCAGCCAGGGCGGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCTTCCAGGGCGGGT TCACCATCAGCGGGGACAAACGCCAAGAGCACCCCTGAGGCTGCAGATGTCCA GCCTGAAGTCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCAGCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTTCGGCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTGTCT3'
	4.7 VH	5'GAGGTTCAGCTGGTGTGAAAGCGGCGGAGGAGTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTAAGCCA TGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGGGACTGGAATGGGTGGGCACCA TCAGCCAGGGTGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCTGAAGGGCGGGT TCACCATCAGCGGGGACAAACGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCAGCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTTCGGCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACA/TGGTCCA/TC3'

Fig. 28G

SEQ ID NO	Anticuerpo	Secuencia
	4.8 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCA TGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGGTGGCCACCA TCAGCAATCTGGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCAGCCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC3'
	4.9 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCA TGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGGTGGCCACCA TCAGCAATTCAGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCAGCCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC3'
	4.10 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCA TGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGGTGGCCACCA TCAGCGACGGTGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCAGCCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC3'
	4.11 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCA TGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGGTGGCCACCA TCAGCAATGTGGGCAGCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCAGCCGGGCCAGCGAGC GGAGCCACTACTACGCCACCAGCCAGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC3'

Fig. 28H

SEQ ID NO	Anticuerpo	Secuencia
	4.4 VL	5'GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATGACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCTACATGCACT GGTATCAGCAGAAGCCCCGGCACCAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCA GCAAGCTGGCCAGCGGGCGTGCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA CCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACGCCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAGCCCCCTGACCTTTGGAGCCGGCACCA AGGTGGAACTGAAG3'
	4.5 VL	5'GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCTACATGCACT GGTATCAGCAGAAGCCCCGGCACCAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCA GCAAGCTGGCCAGCGGGCGTGCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA CCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACGCCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAGCCCCCTGACCTTTGGAGCCGGCACCA AGGTGGAAATCAAG3'
	4.6 VL	5'GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCTACATGCACT GGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAGTCCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCA GCAAGCTGGCCAGCGGGCGTGCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA CCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACGCCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAGCCCCCTGACCTTTGGAGCCGGCACCA AGGTGGAAATCAAG3'
	4.7 VL	5'GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATGACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCTACATGCACT GGTATCAGCAGAAGCCCCGGCACCAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCA GCAAGCTGGCCAGCGGGCGTGCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA CCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACGCCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAGCCCCCTGACCTTTGGAGCCGGCACCA AGGTGGAACTGAAG3'

Fig. 28I

SEQ ID NO	Anticuerpo	Secuencia
	53.0 VH	5'GAGGTTGAGCTGGAGGAGTCAGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGT CCCTGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCACTAGCTATGCCA TCTCTTGGGTTCCCCAGACTCCCGAGAGAGGCTGGAGTGGGTCCCAACCA TTAGTCATGGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGACGAT TCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGBACACCCCTGTACCTGCAAAATGSGCA GTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACATCCTATCT ACTCTGGTAAGTACCAGGGATACTTTGACTACTGG GGCCAAGGCACCACCTCTCACAGTCTCCTCA3'
	53.0 VL	5'GACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGG AGAGGTCACCATGAGCTGCAGGGCCAGCTCAGGTGTAAATTACATATACT GGTACCAGCAGAGTCTGATGCCCTCCCCCAACTATGGATTTATTTTCAGAT CCAACCTGGCTCCTGGAGTCCAGCTCCGCTTCAGTGGCACTGGGTCTGGGA ACTCTTATTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGGTGAAGATGCTGCCACTT ATTACTGCCAGCAGTTTACTAGTTCCCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCA AGCTGGAAATAAAA3'
	53.1 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGGCGCGCCAGCGGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAGSGACTGGAATGGGTGGCCGTGA TCAGCCACGGCGGCACCTACACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCT TCACCATCAGCCGGGACAAAGCCAAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGACCA GCCTGCGGGGCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCCGCAGACACCCCATCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC3'
	53.1 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGGCCAGCAGCGCCCTGAACCTACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCACCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGGCCAGGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'

Fig. 28J

SEQ ID NO	Anticuerpo	Secuencia
53.2 VH		5'GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTGCCCCAGCCCCCTGGCAAGGACTGGAAATGGGTGGCCACAA TCAGCCACGGCGGCACTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAAAGCCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGGCGGCGGAGGACACCGCCATGTACTACTGCCGCCAGACACCCCATCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC3'
53.2 VL		5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTTCGGGCCAGCAGCGGCTGAACTACATCTACT GGTATCAGCAGAAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCCCCTGGCGTGGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'
53.3 VH		5'GAGGTGCAGCTGGAAAGAGTCCGGCGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTGGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTGCGCCAGACCCCCGAGAAGCGGCTGGAAATGGGTGGCCACAA TCAGCCACGGCGGCACTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAAAGCCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGGCGGCGGAGGACACCGCCATGTACTACTGCCGCCAGGCACCCCATCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCAGCG TGACCGTGTCTCT3'
53.3 VL		5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTTCGGGCCAGCAGCGGCTGAACTACATCTACT GGTATCAGCAGAAAGCCCGAGCGGCTCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCCCCTGGCGTGGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACAGCTACACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'

Fig. 28K

SEQ ID NO	Anticuer do	Secuencia
	53.4 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTSGCGCGGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCCA TGAOCTGGGTGCCCCAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGGTGGGCCAA TCAGCCACGGCGGGCACCTACACCTACTACCCCGACAGCCTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAAACGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGCCGAGGACACCCGCCATGTACTACTGCGGCCAGACACCCCATCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC3'
	53.5 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTSGCGCGGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCCA TGAOCTGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGGTGGGCCAA TCAGCCACGGCGGGCACCTACACCTACTACCGCGACAGCCTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAAACGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGCGGGCCGAGGACACCCGCCATGTACTACTGCGGCCAGACACCCCATCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC3'
	53.6 VH	5'GAGGTGCAGCTGCTTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCA GCCTGAGACTGTCTTSGCGCGGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAGCTACGCCA TGAOCTGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGGTGGGCCAA TCAGCCACGGCGGGCACCTACACCTACTACCGCGACAGCCTGAAGGGCCGGT TCACCATCAGCCGGGACAAACGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGSTGAACA GCCTGCGGGCCGAGGACACCCGCCATGTACTACTGCGGCCAGACACCCCATCT ACAGCGGCAACTACCAGGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC3'

Fig. 28L

SEQ ID NO	Anticuerpo	Secuencia
	53.4 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTGCGGGCCAGCAGCGGCGTGAACTACCTCTACT GGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCCCCTGGCGTGCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'
	53.5 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTGCGGGCCAGCAGCGGCGTGAACTACATCGCCT GGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCCCCTGGCGTGCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'
	53.6 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTGCGGGCCAGCAGCGGCGTGAACTACATCTACT GGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCCCCTGGCGTGCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'
	53.7 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTGCGGGCCAGCAGCGGCGTGAACTACATCTACT GGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGCAACCTGGCGTGCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'

Fig. 28M

SEQ ID NO	Anticuerpo	Secuencia
	53.8 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTGCGGCCAGCAGCGGCGTGAACTACATCTACT GGTATCAGCAGAGCGCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'
	53.9 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTGCGGCCAGCAGCGGCGTGAACTACATCTACT GGTATCAGCAGAGCGCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTTCACCA GCAACCTGGCCTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCA ACGAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCCCTACACCTTCGGCCAAGGCACCA AGCTGGAAATCAAG3'

Fig. 28N

SEQ ID NO	Anticuer no	Secuencia
	82.0 VH	5'GAAGTGAAGCTGGAAGAGTCCGGCCCTGAGGTGGTGCGCCCTGGCGTGT CCGTGAAGATCAGCTGCABGGGCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGCCA TGCCTCGGTGAAACAGAGCCACGCCAAGAGCCTGGAATGGATCGCCCTCA TCAGCACCTACAACGGCAACACCAAGTACAACAGAGTTCAAGGGCAAGG CCACCATGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGCCC GGCTGACCAAGCAGGACAGCGCCATCTACTACTGCCGCCGGTTCTTGAGCC TGCCTACTTCGATGTGTGGGGAGCCGGCACCACCGTGACCGTGTCTAGC3 ,
	82.0 VL	5'GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCGCCATCCTGTCTGCCCCCTCTGGCG AGAAAGTGACCATGACCTGCCGGGCCAGCAGCAGCGTGATCTACATGTACT GGTATCAGCAGAGCCCGGCAGCAGCCCCAAGCCCTGGATCTACGCCACCA GCCAGCTGGCCAGCGCGGTGCCAGTCCGGTTTAGCCGCAGCGGCTCTGGCA CCAGCTACAGCCTGACCATCAGCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCGAGCCCCCTGACCTTCGGAGCCGGCACCA AGCTGGAAGTGAAG3'
	82.1 VH	5'CAGGTGAACTGGTGCAGTCTGGCGCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCA GGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGCCA TGCCTGGGTGCGCCAGGCCCTTGCCAGAGACTGGAATGGATCGGCTGGA TCAGCACCTACAACGGCAACACCAAGTACAGCCAGAAGTTCAGGGCAGAG CCACCATGACCGTGGACAAGAGCGCCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCA GGCTGCCGAGCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCCGCCGGTTCTTGAGCC TGCCTACTTCGACGTGTGGGGCAAGGGCACACCGTGACCGTGTCCAGC3 ,
	82.1 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGG ACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGGCCAGCAGCAGCGTGATCTACCTGCCCT GGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCCCTGGATCTACGCCACCA GCACACTGCAGAGCGCGGTGCCAGCAGATTGAGCGGCAGCGGCTCTGGCA CCGAGTACACCTGACCATCAGTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCGAGCCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCACCA AGGTGGAATCAAG3'

Fig. 280

SEQ ID NO	Anticuerpo	Secuencia
82.2 VH		5' CAGGTGAAACTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCA GCGTGAAGGTGTCTCTGCAAGGGCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGCCA TGCACTGGGTGGCCAGGCCCCCTGGCCAGAGACTGGAATGGATCGGCGTGA TCAGCACCTACAACGGCAACACCAAGTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAGAG CCACCATGACCGTGGACAAGAGCGGCGAGCACCGCCTACATGGAACCTGAGCA GCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCATCTACTACTGCGGCCGGTTCTCTGAGCC TCCGGTACTTCGATGTGTGGGAGCGCGCACCAACCGTGACCGTGTCTAGC3'
82.2 VL		5' GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGGCCAGCAGCAGCGTGATCTACATGTACT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCCCTGGATCTACGCCACCA GCAAGCTGGCCAGCGGCGTGGCCAGCAGATTTCTGCGAGCGGAGCGGCA CCGAGTACACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCGAGCCCTGACCTTCGGAGCCGGCACCA AGGTGGAAATCAAG3'
82.3 VH		5' CAGGTGAAACTGGTGCAGAGCGGCCCTGAAGTGAAGGTGCCAGGCGCCA GCGTGAAGGTGTCTCTGCAAGGGCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGCCA TGCACTGGGTGGCCAGGCCCCCTGGCCAGAGCCTGGAATGGATCGGCGTGA TCAGCACCTACAACGGCAACACCAAGTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAGAG CCACCATGACCGTGGACAAGAGCGGCCAGCACCGGCTACATGGAACCTGAGCC GCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCATCTACTACTGCGGCCGGTTCTCTGAGCC TCCGGTACTTCGATGTGTGGGAGCGCGCACCAACCGTGACCGTGTCTAGC3'
82.3 VL		5' GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGCTGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGGCCAGCAGCAGCGTGATCTACATGTACT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGCGGCCCCCAAGCCCTGGATCTACGCCACAA GCAAGCTGGCCAGCGGCGTGGCCGCTGCGGTTTAGCGGCTCTGGCAGCGGCA CCAGCTACACCTGACCATCAGCGGCTGCAGGCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCGAGCCCTGACCTTCGGAGCCGGCACCA AGGTGGAAATCAAG3'

Fig. 28P