(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 848 555**

(51) Int. CI.:

A61P 31/14 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2010 E 17173548 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 3260136**

(54) Título: **Anticuerpos neutralizantes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)**

(30) Prioridad:

17.03.2009 US 161010 P
01.04.2009 US 165829 P
10.07.2009 US 224739 P
11.12.2009 US 285664 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.08.2021

(73) Titular/es:

THERACLONE SCIENCES, INC. (33.3%)
Seattle Life Sciences Building 1124 Columbia Street Suite 300
Seattle, WA 98104, US;
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (33.3%) y
INTERNATIONAL AIDS VACCINE INITIATIVE (33.3%)

(72) Inventor/es:

CHAN-HUI, PO-YING;
MITCHAM, JENNIFER;
OLSEN, OLE;
FREY, STEVEN;
MOYLE, MATTHEW;
PHOGAT, SANJAY K.;
BURTON, DENNIS;
WALKER, LAURA MARJORIE;
POIGNARD, PASCAL RAYMOND GEORGES;
SIMEK-LEMOS, MELISSA DANIELLE, DE JEAN DE ST.MARCEL;
KOFF, WAYNE y
KAMINSKY, STEPHEN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos neutralizantes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

Campo de la invención

La presente memoria descriptiva se refiere en general a la terapia, el diagnóstico y la supervisión de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La memoria descriptiva se refiere más específicamente a anticuerpos monoclonales neutralizantes humanos específicos de VIH-1, tales como anticuerpos monoclonales neutralizantes amplios y potentes específicos para VIH-1 y su fabricación y uso. La neutralización amplia sugiere que los anticuerpos pueden neutralizar aislados de VIH-1 de diferentes individuos. Dichos anticuerpos son útiles en composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de VIH, y para el diagnóstico y supervisión de infección por VIH y para el diseño de inmunógenos de vacunas de VIH. En más detalle, sin embargo, la presente invención proporciona un anticuerpo anti VIH monoclonal completamente humano aislado, en el que dicho anticuerpo es PG16 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 (también denominado “el anticuerpo de la invención”).

Antecedentes de la invención

El SIDA se notificó por primera vez en los Estados Unidos en 1981 y se ha convertido desde entonces en una epidemia mundial importante. El SIDA está provocado por el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH. Destruyendo o dañando células del sistema inmunitario del cuerpo, el VIH destruye progresivamente la capacidad del cuerpo para luchar contra infecciones y ciertos cánceres. Las personas a las que se ha diagnosticado SIDA pueden adquirir enfermedades con peligro para la vida denominadas infecciones oportunistas. Estas infecciones están provocadas por microbios tales como virus o bacterias que habitualmente no hacen enfermar a personas sanas. El VIH se propaga más frecuentemente mediante sexo sin protección con un compañero infectado. El VIH también se propaga mediante el contacto con sangre infectada.
El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es la causa del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Barre-Sinoussi, F., *et al*., 1983, Science 220:868-870; Gallo, R., *et al*., 1984, Science 224: 500-503). Existen en la actualidad 1,25 millones de personas en los Estados Unidos infectadas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida inducido por VIH según un informe del Centro para el Control de Enfermedades. La epidemia está creciendo más rápidamente entre poblaciones minoritarias y es una causa de muerte principal de hombres afroamericanos de edades entre 25 y 44. En consecuencia, el SIDA afecta a casi siete veces más afroamericanos y tres veces más hispanos que a blancos. En años recientes, un número creciente de mujeres y niños afroamericanos están siendo afectados por el VIH/SIDA. Con más de 40 millones de personas infectadas en todo el mundo, la pandemia del VIH global actual se clasifica entre las mayores plagas de enfermedad infecciosa en la historia humana.

Moulard, M., *et al*. PNAS 99, 6913-6918 (2002) se refieren a Fab monoclonal humano que neutraliza VIH-1 con reacción cruzada amplia seleccionado para unirse a complejos gp120-CD4-CCR5. Zhang, M.-Y., *et al*. J Virol 78, 9233-9242 (2004) identificaron un Fab hMAb nuevo, m14, que neutraliza una serie de aislados de VIH-1 primarios de clados diferentes. Los autores sugieren que puede usarse en combinación con otros hMAb que tienen escasa actividad neutralizante o carecen de actividad contra dichos aislados debido a que m14 neutraliza de forma potente aislados representativos de los clados A, B, C y F. Asimismo, Zhang, M.-Y., *et al*. J Virol 82, 6869-6879 (2008) informan de un anticuerpo humano que neutraliza VIH-1 con reacción cruzada específica de gp41 que no tiene reactividad detectable frente a autoantígenos. Los autores indicaron que su epítopo conformacional conservado en gp41 podría ser útil en el diseño de inmunógenos de vacuna y como una diana para productos terapéuticos. Pantophlet R. y D.R. Burton Annu Rev Immunol 24, 739-769 (2006) revisan la subunidad gp120 como diana para neutralizar anticuerpos de VIH-1. La solicitud de patente de los Estados Unidos n.º US 2007/0292390 A1 proporciona polipéptidos que se unen con un epítopo de la subunidad gp41 de la glucoproteína de la envoltura del VIH-1 y métodos que inhiben una infección por VIH en un mamífero usando dichos polipéptidos.

Existe por lo tanto la necesidad de la identificación y producción eficaz de anticuerpos neutralizantes eficaces contra múltiples clados y cepas del VIH así como el esclarecimiento de los determinantes diana y antigénicos a los que se unen dichos anticuerpos.

Sumario de la invención

Inicialmente, la memoria descriptiva muestra un método para aislar anticuerpos monoclonales ampliamente neutralizantes, potentes, contra VIH. Se obtienen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante infectado por VIH seleccionado con respecto a actividad neutralizante de VIH-1 en el plasma, y se aíslan linfocitos B de memoria para su cultivo *in vitro*. Los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B se exploran después por un ensayo de neutralización primario en un formato de alto rendimiento, y los cultivos de linfocitos B que muestran actividad neutralizante se seleccionan para el rescate de anticuerpos monoclonales. Se ha observado sorprendentemente que los anticuerpos neutralizantes obtenidos por este método no siempre muestran unión a gp120 o gp41 a niveles que

se correlacionen con la actividad de neutralización. Este método permite por lo tanto la identificación de nuevos anticuerpos con propiedades de neutralización para varios clados.

Además, la memoria descriptiva muestra anticuerpos monoclonales humanos dirigidos específicamente contra VIH. Por ejemplo, la memoria descriptiva muestra anticuerpos monoclonales anti VIH humanos y clones hermanos de los mismos. Por ejemplo, un clon hermano ejemplar del anticuerpo 1443 C16 (PG16) es el anticuerpo 1503 H05 (PG16), el anticuerpo 1456 A12 (PG16), el anticuerpo 1469 M23 (PG16), el anticuerpo 1489 I13 (PG16) o el anticuerpo 1480_I08 (PG16).

Por ejemplo, la memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de NGTSSDVGGFDSVS SEQ ID NO: 97), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO : 92), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de NGTSRDVGGFDSVS (SEQ ID NO : 93), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSNSMW (SEQ ID NO: 98) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO : 97), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104), MVTPIFGEAKYSQRFE (SEQ ID NO: 105) y RAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 102) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107), GASNLQNG (SEQ ID NO: 108) y QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104), MVTPIFGEAKYSQRFE (SEQ ID NO: 105) y RRAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 103) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107), GASNLQNG (SEQ ID NO: 108) y QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGGAFSSYAFS (SEQ ID NO: 110), MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 111) y RAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 102) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de RASQTIHTYL (SEQ ID NO: 113), GASTLQSG (SEQ ID NO: 114) y QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGGAFSSYAFS (SEQ ID NO: 110), MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 111) y RRAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 103) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de RASQTIHTYL (SEQ ID NO: 113), GASTLQSG (SEQ ID NO: 114) y QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada

con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGYSFIDYYLH (SEQ ID NO: 116), LIDPENGEARYAEKFQ (SEQ ID NO: 117) AVGADSGSWFDP (SEQ ID NO: 118) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGSKLGDKYVS (SEQ ID NO: 120), ENDRRPSG (SEQ ID NO 121), QAWETTTTTFVF (SEQ ID NO: 44).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGFDFSRQGMH (SEQ ID NO: 123), FIKYDGSEKYHADSVW (SEQ ID NO: 124) y EAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 7) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de NGTSNDVGGYESVS (SEQ ID NO : 126), DVSKRPSG (SEQ ID NO: 127) y KSLTSTRRRV (SEQ ID NO: 45).

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89), EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6), SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104), MVTPIFGEAKYSQRFE (SEQ ID NO: 105), RAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 102), SGGAFSSYAFS (SEQ ID NO: 118) SGFDFSRQGMH (SEQ ID NO: 117), AVGADSGSWFDP (SEQ ID NO: 116), LIDPENGEARYAEKFQ (SEQ ID NO: 111), SGYSFIDYYLH (SEQ ID NO: 110), MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 123), FIKYDGSEKYHADSVW (SEQ ID NO: 124), EAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 7), LISDDGMRKYHSNSMW (SEQ ID NO: 98), en el que dicho anticuerpo se une con y neutraliza VIH-1.

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95), SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41), RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107), GASNLQNG (SEQ ID NO: 108), QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42), RASQTIHTYL (SEQ ID NO: 113), GASTLQSG (SEQ ID NO: 114), QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43), SGSKLGDKYVS (SEQ ID NO: 120), ENDRRPSG (SEQ ID NO: 121), QAWETTTTTFVF (SEQ ID NO: 44), NGTSNDVGGYESVS (SEQ ID NO: 126), DVSKRPSG (SEQ ID NO: 127), KSLTSTRRRV (SEQ ID NO: 45), NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92), NGTSRDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 93), en el que dicho anticuerpo se une con y neutraliza VIH-1.

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena pesada con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89), EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6), SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104), MVTPIFGEAKYSQRFE (SEQ ID NO: 105), RRAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 103), SGGAFSSYAFS (SEQ ID NO: 110), MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 111), SGYSFIDYYLH (SEQ ID NO: 116), LIDPENGEARYAEKFQ (SEQ ID NO: 117), AVGADSGSWFDP (SEQ ID NO: 118), SGFDFSRQGMH (SEQ ID NO: 123), FIKYDGSEKYHADSVW (SEQ ID NO: 124), EAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 7), LISDDGMRKYHSNSMW (SEQ ID NO: 98), en el que dicho anticuerpo se une con y neutraliza VIH-1.

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado, en el que dicho anticuerpo tiene una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95), SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41), RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107), GASNLQNG (SEQ ID NO: 108), QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42), RASQTIHTYL (SEQ ID NO: 113), GASTLQSG (SEQ ID NO: 114), QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43), SGSKLGDKYVS (SEQ ID NO: 120), ENDRRPSG (SEQ ID NO: 121), QAWETTTTTFVF (SEQ ID NO: 44), NGTSNDVGGYESVS (SEQ ID NO: 126), DVSKRPSG (SEQ ID NO: 127), KSLTSTRRRV (SEQ ID NO: 45), NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92), NGTSRDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 93), en el que dicho anticuerpo se une con y neutraliza VIH-1.

La memoria descriptiva muestra un anticuerpo anti VIH aislado o fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo incluye: (a) una región CDR1 V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, 104, 110, 116 o 123; (b) una región CDR2 V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, 89, 91, 105, 111, 117 o 124; y (c) una región CDR3 V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 102, 103, 118 o 7, en el que dicho anticuerpo se une con y neutraliza VIH-1. En ciertos aspectos, este anticuerpo incluye además: (a) una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, 92, 97, 94, 107, 113, 120 o 126; (b) una región CDR2 V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, 108, 114, 121 o 127; y (c) una región CDR3 V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 o 45.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti VIH monoclonal completamente humano aislado en donde dicho anticuerpo es PG16 que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

La memoria descriptiva muestra además un anticuerpo anti VIH monoclonal completamente humano aislado que

incluye: a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, o b) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, o c) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 38, o d) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, o e) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96, o f) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, o g) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, o h) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. Además, la invención proporciona una composición que incluye el anticuerpo anti VIH aislado como se ha descrito anteriormente.

Opcionalmente, un anticuerpo monoclonal humano anti VIH se aísla de un linfocito B de un donante humano infectado por VIH-1. En algunas realizaciones, el anticuerpo es eficaz en la neutralización de una pluralidad de diferentes clados de VIH. En algunas realizaciones, el anticuerpo es eficaz en la neutralización de una pluralidad de diferentes cepas dentro del mismo clado de VIH-1. En algunas realizaciones, el anticuerpo neutralizante se une con las proteínas de la envoltura del VIH gp120 o gp41 o la proteína de la envoltura en pseudoviriones del VIH-1 o se expresa en superficies celulares transfectadas o infectadas. En algunas realizaciones, el anticuerpo neutralizante no se une con proteínas de la envoltura recombinantes o monoméricas gp120 o gp41 o proteína de la envoltura en pseudoviriones de VIH-1 o expresada en superficies celulares transfectadas o infectadas pero se une con formas triméricas naturales de las proteínas Env del VIH-1.

En una realización específica, sin embargo, la presente invención proporciona el anticuerpo monoclonal humano PG16 como se ha descrito anteriormente, en el que el anticuerpo es un anticuerpo ampliamente neutralizante, potente (bNAb). En algunas realizaciones, un anticuerpo ampliamente neutralizante se define como un bNAb que neutraliza especies de VIH-1 que pertenecen a dos o más clados diferentes. En algunas realizaciones, los clados diferentes se seleccionan del grupo que cosiste en clados A, B, C, D, E, AE, AG, G o F. En algunas realizaciones las cepas de VIH-1 de dos o más clados comprenden virus de clados distintos de B.

En algunas realizaciones, un anticuerpo ampliamente neutralizante se define como un bNAb que neutraliza al menos el 60 % de las cepas del VIH-1 enumeradas en las Tablas 18A-18F. En algunas realizaciones, se neutralizan al menos el 70 %, o al menos el 80 % o al menos el 90 % de las cepas del VIH-1 enumeradas en las Tablas 18A-18F.

En algunas realizaciones, un anticuerpo ampliamente neutralizante, potente, se define como un bNAb que presenta una potencia de neutralización de al menos una pluralidad de especies de VIH-1 con un valor de CI50 de menos de 0,2 µg/ml. En algunas realizaciones la potencia de neutralización de la especie de VIH-1 tiene un valor de CI50 de menos de 0,15 µg/ml, o menos de 0,10 µg/ml o menos de 0,05 µg/ml.
Un anticuerpo ampliamente neutralizante, potente, también se define como un bNAb que presenta una potencia de neutralización de al menos una pluralidad de especies de VIH-1 con un valor de CI90 de menos de 2,0 µg/ml. En algunas realizaciones la potencia de neutralización de las especies de VIH-1 tiene un valor de CI90 de menos de 1,0 µg/ml o menos de 0,5 µg/ml.

Los anticuerpos monoclonales ejemplares que neutralizan VIH-1 incluyen 1496_C09 (PG9) 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14), y 1495_C14 (PGC14) descrito en el presente documento. Como alternativa, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que se une con el mismo epítopo que 1496_C09 (PG9) 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14). Específicamente, los anticuerpos monoclonales PG9 y PG16 son anticuerpos neutralizantes potentes y amplios. Los anticuerpos se denominan respectivamente en el presente documento anticuerpos de VIH.

La invención proporciona varios anticuerpos monoclonales humanos aislados, en los que cada uno de dichos anticuerpos monoclonales se une con células infectadas o transfectadas por VIH-1; y se une con virus VIH-1. Se proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene potencia en la neutralización de VIH-1, o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de la invención muestra mayor índice de neutralización y/o una mayor afinidad por la unión con las proteínas de la envoltura gp120 o gp41 que mAb anti VIH conocidos en la técnica, tales como el mAb b12. (Burton DR *et al*., Science Vol. 266. n.º 5187, pp. 1024 - 1027). Los anticuerpos monoclonales ejemplares 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14) muestran unión con la glucoproteína de la envoltura gp120, pero no gp41, en un ensayo de ELISA, sin embargo la unión con gp120 no siempre se correlaciona con actividad de neutralización contra cepas específicas de VIH-1. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, por ejemplo 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9), no presentan ninguna actividad de unión a gp120 o presentan actividad de unión a gp120 débil frente a una cepa particular pero se unen con trímero de VIH-1 en superficie celular transfectada o infectada y/o virión y muestran

actividad de neutralización potente y amplia contra esa cepa de VIH-1.

Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14); que comprende una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la cadena pesada de 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14); que comprende una cadena pesada que comprende una CDR selecciona del grupo que consiste en las CDR de la cadena pesada de 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14); que comprende una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la cadena ligera de 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14); que comprende una cadena ligera que comprende una CDR seleccionada del grupo que consiste en las CDR de la cadena ligera de 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14).

La invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo, tal como fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv que se une con un epítopo o polipéptido inmunogénico capaz de unirse con el anticuerpo 1443_C16 (PG16). La invención también se refiere a polipéptidos inmunogénicas que codifican dichos epítopos.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican dichos anticuerpos, y vectores y células que portan dichos ácidos nucleicos.

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo PG16 o fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere a un método de inmunización, prevención o inhibición de la infección por VIH o una enfermedad relacionada con VIH, que comprende las etapas de identificación de un paciente que necesite dicho tratamiento y administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal de la invención como se ha descrito anteriormente.

En un aspecto adicional, el anticuerpo de VIH de acuerdo con la invención puede unirse con un agente terapéutico o un marcador detectable.

Adicionalmente, la invención proporciona métodos para estimular una respuesta inmunitaria, tratar, prevenir o aliviar un síntoma de una infección vírica por VIH administrando el anticuerpo de VIH PG16 de la invención a un sujeto.

En otro aspecto, el anticuerpo PG16 de la invención puede usarse en métodos para administrar el anticuerpo de VIH de la invención a un sujeto antes y/o después de exposición a un virus VIH. Por ejemplo, el anticuerpo de VIH de la invención puede usarse para tratar o prevenir infección por VIH. El anticuerpo de VIH puede administrarse a una dosis suficiente para promover la eliminación vírica o eliminar células infectadas por VIH.

Además, el anticuerpo PG16 de la invención puede usarse en un método para determinar la presencia de una infección por virus VIH en un paciente, poniendo en contacto una muestra biológica obtenida del paciente con un anticuerpo de VIH; detectar una cantidad del anticuerpo que se une con la muestra biológica; y comparar la cantidad de anticuerpo que se une con la muestra biológica con un valor de control.

Además, el anticuerpo PG16 de la invención puede usarse en un kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo monoclonal de VIH.

La invención se refiere a un anticuerpo ampliamente neutralizante (bNAb) en el que el anticuerpo neutraliza al menos un miembro de cada clado con una potencia mayor que la de los bNAb b12, 2G12, 2F5 y 4E10, respectivamente.

La invención se refiere a un anticuerpo ampliamente neutralizante (bNAb) en el que el anticuerpo no se une con proteínas gp120 o gp41 monoméricas del gen de env del VIH-1. El anticuerpo se une con mayor afinidad con formas triméricas de la Env del VIH-1 expresada en una superficie celular que con la gp120 monomérica o gp140 trimerizada artificialmente. En algunos aspectos, el anticuerpo se une con alta afinidad con trímeros de gp160 del VIH-1 no escindidos en una superficie celular.

La invención se refiere a un anticuerpo ampliamente neutralizante (bNAb) en el que el anticuerpo se une con un epítopo dentro del bucle variable de gp120, en el que el epítopo comprende las regiones conservadas de los bucles V2 y V3 de gp120, en el que el epítopo comprende un sitio de N-glucosilación en el resto Asn-160 dentro del bucle V2 de gp120, en el que el anticuerpo se une con un epítopo presentado por un pico trimérico de gp120 en una superficie celular, en el que el epítopo no se presenta cuando gp120 está artificialmente trimerizada. En algunas realizaciones, el anticuerpo no neutraliza el VIH-1 en ausencia de sitio de N-glucosilación en el resto Asn-160 dentro del bucle V2 de gp120.

La invención se refiere al anticuerpo ampliamente neutralizante (bNAb) PG16.

La invención se refiere a un antígeno o un polipéptido inmunogénico, o una vacuna que comprende dicho antígeno o polipéptido inmunogénico, para producir un anticuerpo ampliamente neutralizante (bNAb) por una respuesta inmunitaria, comprendiendo el antígeno un epítopo dentro del bucle variable de gp120 de acuerdo con la invención.

La invención se refiere a un método para inmunización pasiva o activa de un individuo contra una pluralidad de especies de VIH-1 a través de uno o más clados, comprendiendo el método: proporcionar un anticuerpo ampliamente neutralizante (bNAb) en el que el bNAb neutraliza especies de VIH-1 que pertenecen a dos o más clados, y además en el que la potencia de neutralización de al menos un miembro de cada clado se determina por un valor de CI50 de menos de 0,005 µg/ml. De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo es PG16.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se produce por inmunización activa con un antígeno que comprende un epítopo dentro del bucle variable de gp120, en el que el epítopo comprende las regiones conservadas de bucles V2 y V3 de gp120 o en el que el epítopo comprende un sito de N-glucosilación en el resto Asn-160 dentro del bucle V2 de gp120. En algunos aspectos, el epítopo se presenta por un pico trimérico de gp120 en una superficie celular, y el epítopo no se presenta cuando gp120 es monomérica o está artificialmente trimerizada.

Otros elementos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de y están abarcados por la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es un diagrama en árbol esquemático de secuencias de región variable alineadas por Clustal W de cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales.

La Figura 1B es un diagrama en árbol esquemático de secuencias de región variable alineadas por Clustal W de cadenas ligeras de los anticuerpos monoclonales.

La Figura 2 es un diagrama de flujo del proceso para el aislamiento de anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención.

La Figura 3A es un diagrama esquemático que resume los resultados de exploración para neutralización y ensayos de unión de proteína env del VIH (gp120 y gp41) a partir de los que se seleccionaron cultivos de linfocitos B para el rescate de anticuerpos y se obtuvieron los anticuerpos monoclonales 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14). Se usó un valor de índice de neutralización de 1,5 como punto de corte.

La Figura 3B es un diagrama esquemático que resume la actividad neutralizante y actividades de unión a proteína env del VIH (gp120 y gp41) de los anticuerpos monoclonales 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14) como se determinó por ensayos de ELISA entre los sobrenadantes de linfocitos B usando un valor de punto de corte de índice de neutralización de 2,0. El índice de neutralización se expresó como la relación de unidades de luminiscencia relativa (ULR) normalizadas de SIVmac239 con respecto a la de la cepa vírica de ensayo derivada del mismo sobrenadante de cultivo de linfocitos B de ensayo. Los valores de punto de corte usados para distinguir los aciertos de neutralización se determinaron mediante el índice de neutralización de un gran número de pocillos de control negativo que contienen sobrenadantes de cultivo de linfocitos B derivados de donantes sanos.

La Figura 4 es una serie de gráficos que representan la actividad de neutralización de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) para pseudovirus adicionales no incluidos en las Tablas 17A y 17B.

La Figura 5 es un gráfico que representa las curvas de respuesta a dosis de 1456_P20 (PG20), 1495_C14 (PGC14) y 1460_G14 (PGG14) que se unen con gp120 recombinante en ELISA en comparación con anti gp120 (b12) de control. Los datos se presentan como valores de DO promedio de pocillos de ELISA por triplicado obtenidos en la misma placa.

La Figura 6 es una serie de gráficos que representan los resultados de ensayos de unión de ELISA de anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) con VIH-1 YU-2 gp140, JR-CSFgp120, péptido de regiones externas próximas a membrana (MPER) de polipéptido de gp41 y V3.

La Figura 7 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de unión usando anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) para VIH-1 YU-2 gp160 expresada en la superficie celular en presencia y ausencia de CD4 soluble (sCD4).

La Figura 8 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de unión usando anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) para células transfectadas con VIH-1 gp160.

La Figura 9 es una serie de gráficos que representan los resultados de un ensayo de captura. Los datos describen la captura de pseudovirus JRCSF competente para entrada mediante anticuerpos monoclonales neutralizantes 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) de una manera dependiente de dosis.

La Figura 10A es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de unión competitivo usando anticuerpos monoclonales sCD4, PG16 y PG9, en el que los anticuerpos reivindicados compiten por la unión del anticuerpo monoclonal 1443_C16 (PG16) con el pseudovirus pero los anticuerpos de control b12, 2G12, 2F5 y 4E10 no se unen de forma competitiva con el pseudovirus.

La Figura 10B es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de unión competitiva usando anticuerpos monoclonales sCD4, PG16 y PG9, en el que los anticuerpos reivindicados compiten por la unión del

anticuerpo monoclonal 1496_C09 (PG9) con pseudovirus pero los anticuerpos de control b12, 2G12, 2F5 y 4E10 no se unen de forma competitiva con el pseudovirus.

La Figura 11A es una serie de gráficos que representa los resultados de un ensayo de unión usando PG9 y PG16. Los datos muestran que PG9 y PG16 se unen con gp120 monomérica y construcciones de gp140 trimerizada artificialmente como se determina por ELISA. Se usó IgG b12 como un control para ensayos de ELISA.

La Figura 11B es una serie de gráficos que representan los resultados de un ensayo de unión usando PG9 y PG16. Los datos muestran que PG9 y PG16 se unen con Env expresada en la superficie de células 293T como se determina por citometría de flujo. El bNAb b12 y el anticuerpo no neutralizante b6 se incluyen en los ensayos de unión de superficie celular para mostrar los porcentajes esperados de Env escindida y no escindida expresada en la superficie celular.

La Figura 12 es una serie de gráficos que representan los resultados de un ensayo de unión usando PG9 y PG16 y trímeros VIH-1 YU2 defectuosos en escisión. PG9 y PG16 se unen con alta afinidad con trímeros VIH-1 YU2 defectuosos en escisión como se determina por citometría de flujo. Se generaron curvas de unión representando el IFM de unión a antígeno en función de la concentración de anticuerpo.

La Figura 13A-E es una serie de gráficos que representan el mapeo de epítopos PG9 y PG16. El anticuerpo competidor se indica en la parte superior de cada gráfico. 2G12 se incluye para controlar con respecto a expresión de Env de superficie celular. A: PG9 y PG16 compiten entre sí por la unión a Env en superficie celular y ninguno de los anticuerpos compite con el anticuerpo CD4bs b12 por la unión con Env. B: el ligamiento de Env en superficie celular con sCD4 reduce la unión de PG9 y PG16. 2G12 se incluye para controlar con respecto a desprendimiento inducido por CD4 de gp120. C: sCD4 inhibe la unión de PG9 con gp140YU-2 trimerizado artificialmente como se determina por ELISA. D: PG9 compite con 10/76b (anti V2), F425/b4e8 (anti V3) y X5 (CD4i) por la unión con gp120 en ensayos de ELISA de competición. E: PG9 y PG16 no consiguen unirse con variantes de VIH-1 JR-CSF con supresión de bucle variable expresadas en la superficie de células 293T.

La Figura 14 es una serie de gráficos que representa los resultados de ensayos de ELISA de competición usando un anticuerpo monoclonal PG9.

La Figura 15 es un gráfico que representa la unión de anticuerpo monoclonal, PG9 o PG16, con VIH-1 JR-FLΔCT E168K Env expresada en la superficie de células 293T como se determina por citometría de flujo.

La Figura 16 es un gráfico que representa la unión del anticuerpo monoclonal PG9 con gp120 desglucosilado.

La Figura 17 es una serie de gráficos que representa la actividad de neutralización de PG9 y PG16 contra VIH-1 SF162 y VIH-1 SF162 K160N, que se determinó usando un ensayo indicador de luciferasa de replicación de un único ciclo de virus pseudotipificado.

La Figura 18 es una serie de gráficos que representa la unión de PG9 y PG16 con trímeros mixtos. Se introdujeron sustituciones de alanina en las posiciones 160 y 299 en VIH-1 YU2 Env para anular la unión de PG9 y PG16. Se introdujo también una sustitución de alanina en la posición 295 en la misma construcción para anular la unión de 2G12. La cotransfección de células 293T con plásmidos WT y mutantes en una relación 1:2 dio como resultado la expresión de 29 % de homotrímeros mutantes, 44 % de heterotrímeros con dos subunidades mutantes, 23 % de heterotrímeros con una subunidad mutante y 4 % de homotrímeros de tipo silvestre.

La Figura 19 es una serie de representaciones gráficas de las varias diferencias en el número de nucleótidos o aminoácidos en las secuencias de cadena pesada de clones hermanos de 1443 C16 (PG16) entre sí. Obsérvese que la diferencia de un único nucleótido de 1408 108 se traduce en una secuencia proteica idéntica de 1443 C16. La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 1408 108 es idéntica a la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 1443 C16.

La Figura 20A es un diagrama de árbol que ilustra la correlación de la cadena pesada de clones hermanos de 1443 C16 con la cadena pesada de 1496 C09 al nivel de nucleótidos.

La Figura 20B es un diagrama de árbol que ilustra la correlación de la cadena ligera de clones hermanos de 1443 C16 con la cadena ligera de 1496 C09 al nivel de nucleótidos.

La Figura 21A es un diagrama de árbol que ilustra la correlación de la cadena pesada de clones hermanos de 1443 C16 con la cadena pesada de 1496 C09 al nivel de proteínas.

La Figura 21B es un diagrama de árbol que ilustra la correlación de la cadena ligera de clones hermanos de 1443 C16 con la cadena ligera de 1496 C09 al nivel de proteínas.

Descripción detallada de la invención

En los sueros de pacientes infectados por virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), pueden detectarse anticuerpos de antivirus durante un cierto periodo después de la infección sin ninguna manifestación clínica del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En este estado de respuesta inmunitaria activa, se esperan altos números de linfocitos-B específicos antígeno en la circulación. Estos linfocitos-B se usan como compañeros de fusión para la generación de anticuerpos anti-VIH monoclonales humanos. Una desventaja importante para encontrar una composición de vacuna adecuada para prevención más fiable de individuos humanos de infección por VIH-1 y/o para tratamiento terapéutico más exitoso de pacientes infectados es la capacidad del virus VIH-1 para escapar la captura por anticuerpos mediante variación genética, lo que con frecuencia hace que los intentos notables de los investigadores sean casi inútiles. Dichos mutantes de escape pueden caracterizarse por un cambio de solamente uno o varios de los aminoácidos dentro de uno de los determinantes antigénicos diana y puede producirse, por ejemplo, como resultado de mutación espontánea o inducida. Además de la variación genética, algunas otras propiedades de la glucoproteína de envoltura del VIH-1 hace difícil inducir anticuerpos

neutralizantes lo que hace la generación de anticuerpos no neutralizantes indeseables un problema importante (véase Phogat SK y Wyatt RT, Curr Pharm Design 2007;13(2):213-227).

El VIH-1 está entre los patógenos víricos genéticamente más diversos. De las tres ramas principales del árbol filogenético del VIH-1, los grupos M (principal), N (nuevo) y O (atípico), los virus del grupo M son los más extendidos, representando más del 99 % de las infecciones globales. Este grupo se divide en la actualidad en nueve subtipos genéticos definidos, o clados (de A a K), basándose en secuencias de longitud completa. Env es el gen de VIH-1 más variable, con hasta 35 % de diversidad de secuencia entre clados, 20 % de diversidad de secuencia dentro de los clados, y hasta 10 % de diversidad de secuencia en una única persona infectada (Shankarappa, R. *et al*. 1999. J. Virol. 73:10489-10502). El clado B es dominante en Europa, América y Australia. El clado C es habitual en África del sur, China e India y en la actualidad infecta a más personas en todo el mundo que cualquier otro clado (McCutchan, FE. 2000. Understying the genetic diversity of HIV-1. AIDS 14(Supl. 3):S31-S44). Los clados A y D son prominentes en África central y oriental.

Los anticuerpos neutralizantes (NAb) contra proteínas de envoltura vírica (Env) proporcionan una defensa inmunitaria adaptativa contra exposición al virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) bloqueando la infección de células susceptibles (Kwong PD *et al*., 2002. Nature 420: 678-682). La eficacia de vacunas contra varios virus se ha atribuido a su capacidad para inducir NAb. Sin embargo, a pesar de numerosos esfuerzos, ha habido un progreso limitado para un inmunógeno eficaz para VIH-1. (Burton, D. R. 2002. Nat. Rev. Immunol. 2:706-713).

El VIH-1 ha evolucionado con una serie extensiva de estrategias para evitar la neutralización mediada por anticuerpos (Barouch, D.H. Nature 455, 613-619 (2008); Kwong, P.D. y Wilson, I.A. Nat Immunol 10, 573-578 (2009); Karlsson Hedestam, G.B., *et al*. Nat Rev Microbiol 6, 143-155 (2008)). Sin embargo, se desarrollan anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAb) a lo largo del tiempo en una proporción de individuos infectados por VIH-1 (Leonidas Stamatatos, L.M., Dennis R Burton, y John Mascola. Nature Medicine (E-Pub: 14 Jun. 2009); PMID: 19525964). Se han aislado algunos anticuerpos monoclonales ampliamente neutralizantes de donantes infectados por clado B. (Burton, D.R., *et al*. Science 266, 1024-1027 (1994); Trkola, A., *et al*. J Virol 69, 6609-6617 (1995); Stiegler, G., *et al*. AIDS Res Hum Retroviruses 17, 1757-1765 (2001)). Estos anticuerpos tienden a presentar menor amplitud y potencia frente a virus que no son del clado B, y reconocen epítopos en el virus que hasta la fecha no han conseguido inducir respuestas ampliamente neutralizantes cuando se incorporan en una serie diversa de inmunógenos (Phogat, S. y Wyatt, R. Curr Pharm Design 13, 213-227 (2007); Montero, M., van Houten, N.E., Wang, X. y Scott, J.K. Microbiol Mol Biol Rev 72, 54-84, tabla de contenidos (2008); Scanlan, C.N., Offer, J., Zitzmann, N. y Dwek, R.A. Nature 446, 1038-1045 (2007)).
A pesar de la enorme diversidad del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), todos los virus VIH conocidos hasta la fecha interaccionan con los mismos receptores celulares (CD4 y/o un correceptor, CCR5 o CXCR4). La mayoría de anticuerpos neutralizantes se unen con regiones funcionales implicadas en interacciones de receptor y fusión de membrana celular. Sin embargo, la amplia mayoría de anticuerpos neutralizantes aislados hasta la fecha no reconocen más de un clado, mostrando por lo tanto eficacia protectora limitada *in vitro* o *in vivo*. (Véase Binley JM *et al*., 2004. J. Virol. 78(23): 13232-13252). Los anticuerpos monoclonales (mAb) humanos ampliamente neutralizantes poco habituales que se han aislado de donantes humanos infectados por VIH+ de clado B se unen con productos del gen env de VIH-1, gp 120 y la proteína transmembrana gp41. (Parren, PW *et al*. 1999. AIDS 13:S137-S162). Sin embargo, una característica bien conocida de la glucoproteína de la envoltura del VIH-1 es su extrema variabilidad. Se ha reconocido que epítopos incluso relativamente conservados en VIH-1, tales como el sitio de unión de CD4, muestran algo de variabilidad entre diferentes aislados (Poignard, P., *et al*., Ann. Rev. Immunol. (2001) 19:253-274). Puede esperarse que incluso un anticuerpo dirigido a uno de estos sitios conservados padezca una amplitud de reactividad reducida entre múltiples aislados diferentes.

Los pocos anticuerpos monoclonales reactivos para diferentes clados conocidos hasta la fecha se han aislado por procesos que implican la generación de paneles de anticuerpos víricos específicos de linfocitos de sangre periférica (PBL) de individuos infectados por VIH, bien mediante presentación en fagos o bien mediante técnicas de inmortalización convencionales tales como hibridoma o transformación de virus de Epstein Barr, electrofusión y similares. Estos se seleccionan basándose en la reactividad *in vitro* con proteínas del VIH-1, seguido de ensayos con respecto a actividad de neutralización del VIH.

Se usó un sistema de expresión en superficie de fago de anticuerpo para aislar el Fab neutralizante para diferentes clados (fragmento, unión a antígeno) b12 que aparece en una biblioteca combinatoria. El Fab b12 se exploró seleccionando con respecto a actividad de unión de glucoproteína de la envoltura gp120 y se observó actividad neutralizante contra el aislado de VIH-1 (HXBc2) (Roben P *et al*., J. Virol. 68(8): 4821-4828(1994); Barbas CF *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89, pp. 9339-9343, (1992); Burton DP *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 88, pp. 10134-10137 (1991)).

Se usó la inmortalización de linfocitos B humanos para aislar los anticuerpos monoclonales neutralizantes para diferentes clados 2G12, 2F5 y 4E10 de individuos infectados por VIH. El anticuerpo monoclonal 2G12 se une con un glucótopo en la glucoproteína de superficie gp120 de VIH-1 y se ha mostrado que presenta patrones neutralizantes amplios (Trkola A., *et al*., J. Virol. 70(2):1100-1108 (1996), Buchacher, A., *et al*., 1994. AIDS Res. Hum. Retroviruses 10:359-369). Se ha descubierto que el anticuerpo monoclonal 2F5 que se había mostrado que se unía con una

secuencia dentro del dominio externo de la glucoproteína de la envoltura gp41 del VIH-1 tiene propiedades de neutralización amplias. (Conley AJ Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 91, pp. 3348-3352 (1994); Muster T *et al*., J. Virol. 67(11):6642-6647 (1993); Buchacher A *et al*., 1992, Vaccines 92:191-195). También se ha descubierto que el anticuerpo monoclonal 4E10, que se une con un nuevo epítopo C terminal de la secuencia ELDKWA en gp41 reconocida por 2F5, tiene potente actividad de neutralización para diferentes clados (Buchacher, A., *et al*., 1994. SIDA Res. Hum. Retroviruses 10:359-369; Stiegler, G., *et al*., 2001. SIDA Res. Hum. Retroviruses 17(18):1757-1765)).

Otros estudios sobre neutralización de anticuerpos de VIH-1 (Nara, P. L., *et al*. (1991) FASEB J. 5:2437-2455.) se han centrado en un único epítopo lineal en la tercera región hipervariable de la glucoproteína de la envoltura vírica gp120 conocida como el bucle V3. Se ha sugerido que los anticuerpos para este bucle neutralizan inhibiendo la fusión de membranas víricas y celulares. Sin embargo, hay variabilidad de secuencia dentro del bucle y los anticuerpos neutralizantes son sensibles a variaciones de secuencia fuera del bucle (Albert J. *et al*., (1990) SIDA 4, 107-112). Por lo tanto, los anticuerpos anti-bucle V3 son con frecuencia específicos de cepa y las mutaciones en el bucle *in vivo* pueden proporcionar un mecanismo para escape vírico de neutralización de anticuerpos. Hay algunos indicios de que no todos los anticuerpos neutralizantes actúan bloqueando la unión del virus, ya que varios anticuerpos monoclonales de ratón que inhibe la unión de CD4 con gp120 son no neutralizantes (Lasky LA, *et al*., (1987) Cell 50:975-985.) o solamente débilmente neutralizantes (Sun N., *et al*., (1989) J. Virol. 63, 3579-3585).

Está ampliamente aceptado que dicha vacuna requerirá inmunidad mediada por linfocitos T así como la inducción de una respuesta de anticuerpo ampliamente neutralizante (bNAb). (Barouch, D.H. Nature 455, 613-619 (2008); Walker, B.D. y Burton, D.R. Science 320, 760-764 (2008); Johnston, M.I. y Fauci, A.S. N Engl J Med 356, 2073-2081 (2007)). Todos los bNAb conocidos proporcionan protección en los mejores modelos de primate disponibles (Veazey, R.S., *et al*. Nat Med 9, 343-346 (2003); Hessell, A.J., *et al*. PLoS Pathog 5, e1000433 (2009); Parren, P.W., *et al*. J Virol 75, 8340-8347 (2001); Mascola, J.R. Vaccine 20, 1922-1925 (2002); Mascola, J.R., *et al*. Nat Med 6, 207-210 (2000); Mascola, J.R., *et al*. J Virol 73, 4009-4018 (1999)). Por lo tanto, los anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAb) se consideran los tipos de anticuerpos que deberían inducirse por una vacuna. Desafortunadamente, los inmunógenos existentes, con frecuencia diseñados basándose en estos bNAb, no han conseguido inducir respuestas de NAb de la amplitud y potencia requeridas. Por lo tanto, es altamente prioritario identificar nuevos bNAb que se unan con epítopos que pueden ser más susceptibles a incorporación en inmunógenos para inducción de respuestas de NAb.

La memoria descriptiva muestra un método para aislar nuevos anticuerpos monoclonales neutralizantes amplios y potentes contra VIH. El método implica selección de un donante de PBMC con alto título de neutralización de anticuerpos en plasma. Se exploran linfocitos B con respecto a actividad de neutralización antes del rescate de anticuerpos. Se obtienen nuevos anticuerpos ampliamente neutralizantes enfatizando la neutralización como la exploración inicial.

La invención se refiere a un anticuerpo ampliamente neutralizante, potente (bNAb) en el que el anticuerpo neutraliza especies de VIH-1 que pertenecen a dos o más clados, y además en el que la potencia de neutralización de al menos un miembro de cada clado se determina por un valor de CI50 de menos de 0,2 µg/ml. En algunos aspectos, los clados se seleccionan de clado A, clado B, clado C, clado D y clado AE. En algunos aspectos, el VIH-1 que pertenece a dos o más clados es virus no de clado B. En algunos aspectos, el anticuerpo ampliamente neutralizante neutraliza al menos 60 % de las cepas de VIH-1 enumeradas en las Tablas 18A-18F. En algunas realizaciones, se neutralizan al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 % de las cepas de VIH-1 enumeradas en las Tablas 18A-18F.

La invención se refiere a un anticuerpo ampliamente neutralizante, potente (bNAb) en el que el anticuerpo neutraliza especies de VIH-1 con una potencia de neutralización de al menos una pluralidad de especies de VIH-1 con un valor de CI50 de menos de 0,2 µg/ml. En algunas realizaciones, la potencia de neutralización de las especies de VIH-1 tiene un valor de CI50 de menos de 0,15 µg/ml, o menos de 0,10 µg/ml, o menos de 0,05 µg/ml. En algunos aspectos, un anticuerpo ampliamente neutralizante, potente, se define como un bNAb que presenta una potencia de neutralización de al menos una pluralidad de especies de VIH-1 con un valor de CI90 de menos de 2,0 µg/ml. En algunas realizaciones la potencia de neutralización de la especie de VIH-1 tiene un valor de CI90 de menos de 1,0 µg/ml, o menos de 0,5 µg/ml.

Se ilustra un método ejemplar en el esquema mostrado en la Figura 4. Se obtuvieron Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) de un donante infectado por VIH seleccionado con respecto a actividad neutralizante de VIH-1 en el plasma. Se aislaron linfocitos B de memoria y se sometieron sobrenadantes de cultivo de linfocitos B a una exploración primaria de ensayo de neutralización en un formato de alto rendimiento. Opcionalmente, también se usaron ensayos de unión a antígeno de VIH usando ELISA o métodos similares como una exploración. Se seleccionaron lisados de linfocitos B correspondientes a sobrenadantes que muestran actividad neutralizante para el rescate de anticuerpos monoclonales mediante métodos recombinantes convencionales.

En una realización, el rescate recombinante del anticuerpo monoclonal PG16 implica el uso de un sistema de cultivo de linfocitos B como se describe en Weitcamp J-H *et al*., J. Immunol. 171:4680-4688 (2003). También puede

emplearse cualquier otro método para el rescate de clones de linfocitos B individuales conocidos en la técnica tal como inmortalización por VEB de linfocitos B (Traggiai E., *et al*., Nat. Med. 10(8):871-875 (2004)), electrofusión (Buchacher, A., *et al*., 1994. SIDA Res. Hum. Retroviruses 10:359-369) e hibridoma de linfocitos B (Karpas A. *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1799-1804 (2001).

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal PG16 se rescató de los cultivos de linfocitos B usando RT-PCR específica de gen de cadena variable y se exploró transfectante con combinaciones de clones de cadena H y L de nuevo con respecto a neutralización y actividades de unión a antígeno del VIH. Se seleccionaron mAb con propiedades de neutralización para caracterización adicional.

Una nueva estrategia de alto rendimiento se usó para explorar sobrenadantes de exploración de cultivo que contenían IgG de aproximadamente 30.000 linfocitos B de memoria activados de un donante infectado por clado A con respecto a unión de gp120JR-CSF y gp41HxB2 monomérico recombinante (Env) así como actividad de neutralización contra VIH-1JR-CSF y VIH-1SF162 (Véase Tabla 1).

Tabla 1: Exploración de linfocitos B de memoria.

Número total de pocillos explorados	23.328
Número de linfocitos B de memoria sIgG+ explorados	30.300
Aciertos de ELISA de gp120	411 (1,36 %)
Aciertos de ELISA de gp41	167 (0,55 %)
Aciertos de neutralización de SF162	401 (1,32 %)
Aciertos de neutralización de JR-CSF	401 (1,32 %)

Inesperadamente, una gran proporción de los sobrenadantes de linfocitos B que neutralizaron VIH-1JR-CSF no se unieron con gp120JR-CSF o gp41HxB2 monoméricos, y hubo solamente un número limitado de cultivos que neutralizaron ambos virus (Fig. 3B). Se rescataron genes de anticuerpos de cinco cultivos de linfocitos B seleccionados con respecto a perfiles funcionales diferentes; uno se unía con gp120 y solamente neutralizaba VIH-1SF162, dos se unían con gp120 y neutralizaban débilmente ambos virus, y dos neutralizaban potentemente VIH-1JR-CSF, no consiguieron neutralizar VIH-1SF162, y no se unieron a gp120 o gp41 monoméricos.

Se desvelan en el presente documento cinco anticuerpos identificados de acuerdo con estos métodos. Los anticuerpos se aislaron de una muestra humana obtenida mediante el protocolo G de la Iniciativa de Vacuna del SIDA Internacional (IAVI) y se produjeron por los cultivos de linfocitos B denominados 1443_C16, 1456_P20, 1460_G14, 1495_C14 o 1496_C09. Se aislaron anticuerpos denominados 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14), 1495_C14 (PGC14) o 1496_C09 (PG9), de los cultivos de linfocitos B correspondientes. Se ha mostrado que estos anticuerpos neutralizan VIH *in vitro*.

El análisis de los genes variables de anticuerpo reveló que dos pares de anticuerpos estaban relacionados por hipermutación somática y que dos de las variantes somáticas contenían bucles de CDRH3 más largos de lo habitual (Tabla 2). Los bucles de CDRH3 largos se han asociado previamente con polirreactividad. (Ichiyoshi, Y. y Casali, P. J Exp Med 180, 885-895 (1994)). Los anticuerpos se ensayaron frente a un panel de antígenos y se confirmó que los anticuerpos no eran polirreactivos.

Tabla 2: Análisis de Secuencia de Genes Variables de mAb

Clon	IGVL[a] de línea germinal	IGVH[a] de línea germinal	CDRL3[b]	SEQ ID NO:	CDRH3[b]	SEQ ID NO:
PG16	VL2-14*01	VH3-33*O5	**S**SLT**DRSH**RIF	1	EAGGP**IWHDDVK**YYDF**N**DGYYNYHY MDV	6
PG9	VL2-14*01	VH3-33*O5	**K**SLT**STRRRV** F	2	EAGGP**DYRNGYN**YYDF**Y**DGYYNYHY MDV	7
PGG1 4	VK1-39*01	VH1-69*12	S**Y**STPRTF	3	DRRVVPMATDNWLDP	8
PG2O	VK2-14*01	VH1-69*12	S**F**STPRTF	4	DRRAVPIATDNWLDP	9
PGC1 4	VL3-1*01	VH1-24*01	AWETTTTTFV FF	5	GAVGADSGSWFDP	10

[a] Las secuencias génicas de línea germinal se determinaron usando la base de datos de IMGT, que está publicada y disponible en imgt.cines.fr. "L" y "K" se refieren a cadenas lamda y kappa respectivamente.

[b] Los aminoácidos en negrita indican diferencias entre variantes somáticas.

ES 2 848 555 T3

Tabla 3A. Sumario de uso de Genes de Cadena Pesada

ID de mAb	Especificidad de mAb	Gen y Alelo V	Identidad del Gen V	Gen y Alelo J	Identidad del Gen J	CDR3
1443_C16	ELISA-negativo	IGHV3-33*05	85,07 % (245/288 nt)	IGHJ6*03	85,48 % (53/62 nt)	AREAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 46)
I456_P20	gp120	IGHV1-69*11 o IGHV1-69*12	85,07 % (245/288 nt)	IGHJ5*02	88,24 % (45/51 nt)	ARDRRAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 47)
1460_G14	gp120	IGHV1-69*11 o IGHV1-69*12	86,11 % (248/288 nt)	IGHJ5*02	86,27 % (44/51 nt)	TRDRRVVPMATDNWLDP (SEQ ID NO: 48)
1495_C14	Gp120	IGHV1-f*01	88,89 % (256/288 nt)	IGHJ5*02	84,31 % (43/51 nt)	AAGAVGADSGSWFDP (SEQ ID NO: 49)
I496_C09	ELISA-negativo	IGHV3-33*05	85,07 % (245/288 nt)	IGHJ6*03	83,87 % (52/62 nt)	VREAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDV(SEQ ID NO: 50)

Tabla 3B. Sumario de Uso de Gen de Cadena Ligera

ID de mAb	Especificidad de mAb	Gen y alelo V	Identidad de gen V	Gen y alelo J	Identidad de Gen J	CDR3	SEQ ID NO:
1443_C16	ELISA negativo	IGLV2-14*01	88,19 % (254/288 nt)	IGLJ2*01. o IGLJ3*01 o IGLJ3*02	83,33 % (30/36 nt)	SSLTDRSHRI	41
1456_P20	gp120	IGKV1-39*01, o IGKV1D-39*01	92,11 % (257/279 nt)	IGKJ5*01	92,11 % (35/38 nt)	QQSFSTPRT	42
1460_G14	gp120	IGKV1-39*01, o IGKV1D-39*01	92,11 % (257/279 nt)	IGKJ5*01	89,47 % (34/38 nt)	QQSYSTPRT	43
1495_C14	gp120	IGLV3-1*01	88,89 % (248/279 nt)	IGLJ2*01. o IGLJ3*01	86,84 % (33/38 nt)	QAWETTTTTFVF	44
1496_C09	ELISA negativo	IGLV2-14*01	91,32 % (263/288 nt)	IGLJ3*02	86,11 % (31/36 nt)	KSLTSTRRRV	45

Los anticuerpos ampliamente neutralizantes de los clones 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) obtenidos por este método no mostraron unión con gp120 o gp41 soluble a niveles que se correlacionan con la actividad de neutralización. El método como se ha desvelado en el presente documento permite por lo tanto la identificación de nuevos anticuerpos con propiedades de neutralización para diferentes clados amplia independientemente de actividades de unión en una exploración de ELISA. Se desvela en el presente documento caracterización adicional de PG16 y PG9.

Los cinco anticuerpos se ensayaron primero con respecto a actividad de neutralización frente a un panel de 16 pseudovirus multi-clado (Tabla 4). Dos de los anticuerpos que se unían con gp120 monomérico en la exploración inicial (PGG14 y PG20) no mostraron amplitud de neutralización o potencia sustancial contra ninguno de los virus ensayados, y el tercer anticuerpo que se unía con gp120 (PGC14) neutralizó 4/16 virus con diversos grados de potencia. Por el contrario, los dos anticuerpos que no consiguieron unirse con Env recombinante en la exploración inicial (PG9 y PG16) neutralizaron una gran proporción de los virus a concentraciones de submicrogramos por ml. PG9 y PG16 neutralizaron virus no de clado B con mayor amplitud que tres de los cuatro bNAb existentes. Esto es significativo considerando que la mayoría de individuos infectados por VIH-1 en todo el mundo están infectados con virus no de clado B.

Tabla 4: Perfiles de Neutralización de mAb Rescatados

		CI50 (µg/ml)				
	Aislado	PGC14	PC9	PG16	PGG14	P20
Clado A	94UG103	>50	0,17	0,008	>50	>50
	92RW020	28,60	0,06	0,004[a]	>50	>50
	93UG077	>50	>50	>50	>50	>50
Clado B	92BR020	0,64	>50	>50	>50	>50
	APV-13	>50	>50	>50	>50	>50
	JRCSF	>50	<0,0025	<0,0025	>50	>50
	APV-17	>50	26,45	>50	>50	>50
	APV-6	7,41	0,09	0,08[a]	>50	25,770
Clado C	93IN905	>50	N/D	0,10[a]	>50	>50
	IAVI-C18	>50	0,05	0,007	>50	>50
	IAVI-C22	>50	N/D	0,069	>50	>50
	IAVI-C3	9,50	12,91	14,80	>50	>50
Clado D	92UG024	>50	10,96	>50	>50	>50
	92UG005	>50	>50	>50	>50	>50
CRF01_AE	92TH021	>50	0,11	0,13[a]	>50	>50
	CMU02	>50	>50	>50	>50	>50
Control negativo	aMLV	>50	>50	>50	>50	>50

[a]Nivel estable observado en la curva

La Tabla 17A muestra perfiles de neutralización (valores de CI50) de los anticuerpos monoclonales 1443_C16

(PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14), 1495_C14 (PGC14) y 1496_C09 (PG9) y los anticuerpos neutralizantes para diferentes clados conocidos b12, 2G12, 2F5 y 4E10 en un panel diverso de 16 pseudovirus de VIH de diferentes clados. 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) neutralizan especies de VIH-1 de los clados A, B, C, D y CRF01_AE con mejor potencia para la mayoría de cepas víricas ensayadas que anticuerpos neutralizantes potentes y amplios conocidos y generalmente aceptados. Sin embargo, los perfiles de neutralización de especies individuales de VIH-1 que pertenecen a estos clados varían entre 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) y los anticuerpos neutralizantes para diferentes clados conocidos b12, 2G12, 2F5 y 4E10. 1495_C14 (PGC14) neutralizan menos especies de VIH-1 de los clados A, B y C en comparación con otros anticuerpos neutralizantes. La Tabla 17B muestra valores de CI90 de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) y los anticuerpos neutralizantes para diferentes clados conocidos b12, 2G12, 2F5 y 4E10 en el mismo panel de pseudovirus. La Figura 4 muestra actividades de neutralización de anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) para otros seis pseudovirus de VIH (YU2, Bal, ADA, DU172, DU422 y ZM197) para clados B y C no incluidos en las Tablas 17A y 17B.

PG9, PG16 y PGC14 se evaluaron a continuación en un panel de pseudovirus multiclado grande que consistía en 162 virus para evaluar adicionalmente la amplitud y potencia de neutralización de estos tres anticuerpos (Tablas 5A-5B, Tablas 18A-18F y Tablas 19A-19B). Los bNAb b12, 2G12, 2F5 y 4E10, así como el suero del donante, también se incluyeron en el panel para comparación. En general, PG9 neutralizó 127 de 162 y PG16 neutralizó 119 de 162 virus con una potencia que superaba con frecuencia de forma considerable la observada para los cuatro bNAb de control.

La mediana de los valores de CI50 y CI90 para virus neutralizados entre todos los clados estaban en un orden de magnitud menor para PG9 y PG16 que cualquiera de los cuatro bNAb existentes (Tabla 5A, Tablas 18A-18F y Tablas 19A-19B). Ambos mAb mostraron mayor amplitud de neutralización general que b12, 2G12 y 2F5 (Tabla 5B, Tablas 18A-18F y Tablas 19A-19B). A concentraciones de anticuerpo bajas, PG9 y PG16 también demostraron mayor amplitud de neutralización que 4E10 (Tabla 5B). Además, ambos mAb neutralizaron potentemente un virus (IAVI-C18) que muestra resistencia a los cuatro bNAb existentes (Tablas 18A-18F). Las curvas de neutralización mAb de neutralización revelan que, mientras que las curvas de neutralización de PG9 muestran pendientes pronunciadas, las curvas de neutralización para PG16 muestran algunas veces pendientes graduales o niveles estables a menos de 100 % de neutralización. Aunque se han indicado previamente curvas de neutralización con perfiles similares (W. J. Honnen *et al*., J Virol 81, 1424 (Feb, 2007), A. Pinter *et al*., J Virol 79, 6909 (Jun, 2005)), el mecanismo de esto no se entiende bien.

La comparación de perfil de neutralización del suero con el perfil de neutralización de PG9, PG16 y PGC14 reveló que estos tres anticuerpos podrían recapitular la amplitud de la neutralización en suero en la mayoría de los casos (Tablas 18A-18F). Por ejemplo, casi todos los virus que se neutralizaron por el suero con una CI50>1:500 se neutralizaron por PG9 y/o PG16 a <0,05 µg/ml. El único caso en el que esto no sucedió fue contra VIH-1SF162, pero este virus se neutralizó potentemente por PGC14. A pesar del hecho de que PG9 y PG16 son variantes somáticas, mostraron diferentes grados de potencia contra varios virus ensayados. Por ejemplo, PG9 neutralizó VIH-16535.30 aproximadamente 185 veces más potentemente que PG16, y PG16 neutralizó VIH-1MGRM-AG-001 aproximadamente 440 veces más potentemente que PG9. En algunos casos, los dos anticuerpos también difirieron en su amplitud de neutralización; PG9 neutralizó nueve virus que no se veían afectados por PG16, y PG16 neutralizó dos virus que no se vieron afectados por PG9.
Basándose en estos resultados, se ha postulado que la neutralización en suero amplia podría estar mediada por variantes de anticuerpos somáticas que reconocen epítopos ligeramente diferentes y presentan diversos grados de amplitud y potencia de neutralización contra cualquier virus dado. A la vista de una respuesta vírica en evolución, parece razonable que el sistema inmunitario pueda seleccionar estos tipos de anticuerpos.

La comparación del perfil de neutralización del suero con el perfil de neutralización de PG9, PG16 y PGC14 reveló que estos tres anticuerpos podrían recapitular la amplitud de la neutralización en suero en la mayoría de los casos. Por ejemplo, casi todos los virus que se neutralizaron por el suero con una CI50>1:1.000 se neutralizaron por PG9 y/o PG16 a <0,005 µg/ml. El único caso en el que no se produjo esto fue contra VIH-1SF162, pero este virus se neutralizó potentemente por PGC14. Las Tablas 5(a) y 5(b) muestran las actividades de neutralización, amplitud y potencia, respectivamente, de PG9, PG16 y PGC14 así como cuatro bNAb de control como se mide por valores de CI50. Las Tablas 19A-19B muestran resultados del mismo análisis usando valores de CI_{90}.

TABLA 5(A). Potencia de neutralización de mAb

		Mediana de CI_{50} (µg/ml) contra virus neutralizados con una CI_{50} <50 µg/ml						
Clado[a]	N.º de virus	b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14
A	27	6,98	17,10	5,70	6,20	0,16	0,11	41,59
B	31	0,80	0,82	2,41	5,22	0,43	0,70	21,88
C	27	6,46	2,93	31,51	2,97	0,22	0,25	11,97
D	25	1,47	7,71	3,17	4,60	0,10	0,02	38,57
CRF01_AE	10	21,53	>50	0,26	0,51	0,08	0,03	>50
CRF_AG	10	10,40	0,95	0,64	1,42	0,80	0,03	45,10
G	15	3,07	31,03	1,24	1,44	0,29	1,21	>50
F	15	>50	9,23	1,78	2,30	0,09	0,08	25,71
Total	162	2,82	2,43	2,30	3,24	0,22	0,15	25,99

Las cajas están clasificadas por colores de la siguiente manera: blanco, mediana de la potencia >50 µg/ml; gris claro, mediana de la potencia entre 2 y 20 µg/ml; gris medio, mediana de la potencia entre 0,2 y 2 µg/ml; gris oscuro, mediana de la potencia <0,2 µg/ml.

[a] los virus CRF_07BC y CRF_08BC no se incluyen en el análisis de clados debido a que solamente hubo un virus ensayado de cada uno de estos clados.

Tabla 5(B). Amplitud de neutralización de mAb

		% de virus neutralizados con una CI_{50} <50 µg/ml						
Clado[a]	N.º de virus	b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14
A	27	30	37	74	96	85	85	11
B	31	58	71	68	97	74	74	29
C	27	33	11	7	96	78	78	19
D	25	48	24	56	96	76	60	8
CRF01_AE	10	30	0	89	100	100	100	0
CRF_AG	10	30	50	80	100	80	60	10
G	15	13	20	80	100	87	73	7
F	15	0	21	87	100	67	64	13
Total	162	35	32	60	98	79	73	15
		% de virus neutralizados con una CI_{50} <1,0 µg/ml						
Clado[a]	N.º de virus	b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14
A	27	0	4	4	0	70	63	0
B	31	32	39	23	0	45	42	3
C	27	7	0	0	11	56	48	0
D	25	12	8	12	8	48	44	0
CRF01_AE	10	11	0	88	80	70	70	0
CRF_AG	10	10	30	60	30	40	50	0
G	15	0	0	27	0	60	33	0
F	15	0	14	13	28	80	79	0
Total	162	11	12	19	12	57	51	1

Las cajas están identificadas por colores de la siguiente manera: blanco, sin virus neutralizados; negro, 1 a 30 % de virus neutralizados; gris claro, 30 a 60 % de virus neutralizados; gris medio, 60 a 90 % de virus neutralizados; gris oscuro, 90 a 100 % de virus neutralizados.

[a] los virus CRF_07BC y CRF_O8BC no están incluidos en el análisis de clados debido a que solamente hubo un virus ensayado de cada uno de estos clados.

A pesar del hecho de que PG9 y PG16 son variantes somáticas, mostraron diferentes grados de potencia contra varios virus ensayados. Por ejemplo, PG9 neutralizó el virus 6535.30 con aproximadamente 100 veces más potencia que PG16, y PG16 neutralizó el virus MGRM-AG-001 con aproximadamente 3000 veces más potencia que PG9. En algunos casos, los dos anticuerpos también difirieron en la amplitud de neutralización; PG9 neutralizó siete virus que no eran neutralizados por PG16, y PG16 neutralizó tres virus que no eran neutralizados por PG9. Sin quedar ligado a la teoría, parece que la neutralización de suero amplia podría estar mediada por variantes somáticas que reconocen epítopos ligeramente diferentes y presentan diversos grados de amplitud y potencia de neutralización contra cualquier virus dado. A la vista de una respuesta vírica en evolución, el sistema inmunitario probablemente seleccione estos tipos de anticuerpos.

Los anticuerpos también se ensayaron con respecto a la capacidad para unirse con proteínas de la envoltura del VIH recombinantes solubles. La Figura 5 muestra curvas de respuesta a dosis de unión de 1456_P20 (PG20), 1495_C14 (PGC14) y 1460_G14 (PGG14) con gp120 recombinante en ELISA en comparación con anti gp120 de control (b12). La Figura 6 muestra ensayos de unión de ELISA de anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9)

para gp140 de VIH-1 cepa YU2 y JR-CSF gp120, la región próxima a membrana (MPER) de la glucoproteína de envoltura del VIH-1 gp41, y el polipéptido V3. PG-9 se une con YU2 gp140 (CI_{50} ~ 20-40 nM), YU2 gp120 y se une débilmente con JR-CSF gp120. Sin embargo, PG16 se une débilmente con YU2 gp120, pero no la forma soluble de la glucoproteína de envoltura del VIH-1, gp120 JR-CSF. Ningún mAb se une con JR-FL gp120, JR-FL gp140, péptido MPER de gp41 o péptido V3.

La Figura 7 muestra unión de anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) con VIH-1 YU2 gp160 expresada en la superficie celular en presencia y ausencia de sCD4.
La inhibición competitiva de la unión por sCD4 indica que la unión de anticuerpo monoclonal 1496_C09 con la proteína de la envoltura del VIH-1 gp160 expresada en la superficie celular está afectada supuestamente debido a los cambios conformacionales inducidos por sCD4. Los datos sugieren además que 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) muestran unión relativamente más fuerte con formas triméricas de la Env de VIH-1 (gp160 y gp140) que con la gp120 monomérica.

La Figura 8 muestra unión de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) con células transfectadas con VIH-1. PG9 y PG16 no se unen con células no transfectadas. PG9 y PG16 se unen con células transfectadas con JR-CSF, ADA e YU2 gp160. PG9 y PG16 no se unen con células transfectadas con JR-FL gp160 (escindidas o no escindidas). PG9 y PG16 no se unen con células transfectadas con ADA ΔV1/ΔV2. La unión de PG9 y PG16 con células transfectadas con JR-CSF gp160 está inhibida por sCD4.

La Figura 9 muestra la captura de pseudovirus JR-CSF competentes para entrada neutralizando los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) de una manera dependiente de dosis. La capacidad de ambos anticuerpos para capturar pseudovirus JR-CSF es mayor que IgG b12 pero comparable a IgG 2G12. Se postula que la captura puede estar mediada por la unión de los mAb con el Env de VIH-1 de los viriones.

La Figura 10A muestra que sCD4, PG16 y PG9 compiten por la unión del anticuerpo monoclonal 1443_C16 (PG16) con pseudovirus JR-CSF pero b12, 2G12, 2F5 y 4E10 no. La Figura 10B muestra que sCD4, PG16 y PG9 compiten por la unión del anticuerpo monoclonal 1496_C09 (PG9) con el pseudovirus JR-CSF pero b12, 2G12, 2F5 y 4E10 no. Esto sugiere que los mAb PG16 y PG9 se unen con gp120 en un sitio diferente de con los que se unen b12 y 2G12. La unión de PG9 y PG16 con proteína de la envoltura del VIH-1 está inhibida de forma competitiva por sCD4. Dado que los MAb no están inhibidos por el sitio de unión a CD4 MAb b12, esto sugiere que PG9 y PG16 se unen a un epítopo que no está disponible para la unión de sCD4 con gp120 como resultado de cambios conformacionales.
La incapacidad de PG9 y PG16 para unirse con gp120JR-CSF o gp41HxB2 monoméricos en la exploración inicial neutralizando al mismo tiempo de forma potente VIH-1JR-CSF sugiere que el epítopo al que se dirigen estos anticuerpos se expresa preferentemente en proteína de la envoltura del VIH trimérica. Se comparó la capacidad de PG9 y PG16 para unirse con gp120 monomérica de varias cepas diferentes, construcciones de gp140 trimerizadas artificialmente y Env trimérica expresada en la superficie de células transfectadas respectivamente. Aunque ambos anticuerpos se unieron con alta afinidad con Env de superficie celular, PG16 no se unió con ninguna de las construcciones de gp120 o gp140 solubles y PG9 se unió solamente débilmente con gp120 monomérica y gp140 trimerizada de ciertas cepas (Figura 11). Se ha mostrado previamente que una fracción sustancial de Env de superficie celular está comprendida por moléculas de gp160 no escindidas. (Pancera, M. y Wyatt, R. Virology 332, 145-156 (2005)). Se confirmó que PG9 y PG16 no muestran especificidad exclusiva por trímeros de VIH-1 nativos por el hecho de que ambos anticuerpos se unieron con alta afinidad con trímeros de VIH-1YU2 defectuosos para escisión expresados en la superficie de células transfectadas (Figura 12).

Se investigaron los epítopos reconocidos por PG9 y PG16. Ya que los anticuerpos PG9 y PG16 son variantes somáticas, reconocen los mismos epítopos o epítopos solapantes. Ambos anticuerpos compitieron de forma cruzada por la unión con células transfectadas con VIH-1JR-CSF (Figura 13A). El ligamiento de gp120 monomérica o Env de superficie celular con CD4 soluble disminuyó la unión tanto de PG9 como de PG16, aunque ninguno de los anticuerpos compitió con anticuerpos del sitio de unión a CD4 por la unión a trímero (Figura 13A-13C). Este resultado sugiere que los cambios conformacionales inducidos por CD4 provocan una pérdida del epítopo al que se dirigen los anticuerpos.

Ya que PG9 se unió suficientemente bien con gp120 de ciertos aislados para generar curvas de unión de ELISA, se realizó ELISA de competición con PG9 usando un panel de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes. Estos datos revelaron que PG9 competía de forma cruzada con anticuerpos anti V2, anti V3 y en menor grado CD4i por gp120. (Figuras 13D y 14). Ni PG9 ni PG16 se unieron con variantes de VIH-1JR-CSF con supresión de V1/V2 o V3 expresadas en la superficie de células transfectadas, lo que sugiere adicionalmente contribuciones de bucles variables en la formación de sus epítopos (Figura 13E).

Para diseccionar la especificidad fina de PG9 y PG16, se realizó exploración de alanina usando un gran panel de mutantes de alanina de Env de VIH-1JR-CSF que se han descrito previamente (Pantophlet, R., *et al*. J Virol 77, 642-658 (2003); Pantophlet, R., *et al*. J Virol 83, 1649-1659 (2009); Darbha, R., *et al*. Biochemistry 43, 1410-1417 (2004); Scanlan, C. N., *et al*. J Virol 76, 7306-7321 (2002)) así como varios nuevos mutantes de alanina. Se generaron pseudovirus que incorporaban mutaciones de alanina de Env individuales, y se ensayaron PG9 y PG16 con respecto a actividad de neutralización contra cada pseudovirus mutante. Las mutaciones que dieron como resultado escape

vírico de neutralización de PG9 y PG16 se consideraron importantes para la formación de los epítopos de PG9 y PG16 (Tablas 12 y 13).

Basándose en estos criterios, y de forma coherente con los experimentos de competición, los restos que forman los epítopos reconocidos por PG9 y PG16 parecen estar localizados en regiones conservadas de los bucles V2 y V3 de gp120. Ciertas mutaciones del sitio de unión a correceptores también tuvieron un efecto en la neutralización de PG9 y PG16, aunque en un menor grado. En general, PG9 y PG16 fueron dependientes de los mismos restos, aunque PG16 era más sensible a mutaciones localizadas en la punta del bucle de V3 que PG9. Resulta interesante que, aunque ninguno de los anticuerpos se unió con células transfectadas con VIH-1JR-FL de tipo silvestre, una mutación de D a K en la posición 168 en el bucle V2 de VIH-1JR-FL generó reconocimiento de PG9 y PG16 de alta afinidad (Tablas 18A-18F). N156 y N160, sitios de N2-glucosilación de V2, también parecen ser críticos en la formación del epítopo ya que las sustituciones en estas posiciones dieron como resultado escape de neutralización de PG9 y PG16. La desglucosilación de gp120 anuló la unión de PG9 (Figura 16), lo que confirma que ciertos glucanos pueden ser importantes en la formación del epítopo.

VIH-1 SF162 contiene un polimorfismo poco habitual de N a K en la posición 160, y la mutación de este resto a un Asn hace a este aislado sensible a PG9 y PG16 (Figura 17).

La unión preferente de PG9 y PG16 con trímeros nativos podría ser una consecuencia de la reticulación de la subunidad gp120 o el reconocimiento de una conformación de gp120 oligomérica preferida. Para abordar esta cuestión, se examinaron los perfiles de unión de PG9 y PG16 con trímeros de VIH-1YU2 mixtos, en los que dos subunidades de gp120 que contenían mutaciones puntuales anularon la unión de los dos anticuerpos. Una tercera sustitución que anula la unión de 2G12, que se une con alta afinidad tanto con gp120 monomérica como con Env trimérica, también se introdujo en la misma construcción como un control interno. El análisis de unión en superficie celular reveló que los tres anticuerpos se unían con los trímeros mixtos con afinidad aparente similar a los trímeros de tipo silvestre y todos se saturaron a un nivel menor similar (Figura 18). Este resultado sugiere que la preferencia de PG9 y PG16 por Env trimérica se debe a la presentación de subunidad gp120 en el contexto del pico trimérico en lugar de reticulación de gp120.

Se ha mostrado que NAb que se unen con epítopos que abarcan partes de los dominios V2 o tanto el V2 como el V3 pueden mostrar potencia comparable a la de PG9 y PG16, aunque estos anticuerpos han presentado hasta la fecha una fuerte especificidad de cepa. (Honnen, W. J., *et al*. J Virol 81, 1424-1432 (2007); Gorny, M. K., *et al*., J Virol 79, 5232-5237 (2005)). Resulta importante que se ha mostrado que los epítopos reconocidos por estos anticuerpos difieren del de la secuencia consenso del clado B solamente en sustituciones de aminoácidos individuales, lo que sugirió la existencia de una estructura relativamente conservada dentro del dominio V2. (Honnen, W. J., *et al*. J Virol 81, 1424-1432 (2007)). Los resultados observados con PG9 y PG16 confirman que esta región actúa como una potente diana de neutralización y demuestra que los anticuerpos que reconocen partes conservadas de V2 y V3 pueden poseer reactividad amplia.

La invención se basa en un nuevo anticuerpo monoclonal y fragmentos de anticuerpos del mismo que neutralizan ampliamente y con potencia la infección por VIH. En algunas realizaciones, este anticuerpo monoclonal y los fragmentos de anticuerpo del mismo tienen una potencia particularmente alta en la neutralización de infección por VIH *in vitro* entre múltiples clados o entre un gran número de diferentes especies de VIH. Dichos anticuerpos son deseables, ya que solamente se requieren bajas concentraciones para neutralizar una cantidad dada del virus. Esto facilita niveles mayores de protección mientras se administran cantidades menores de anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales humanos y los clones de linfocitos B inmortalizados que secretan dichos anticuerpos se incluyen dentro del alcance de la invención.

La memoria descriptiva muestra métodos para usar exploración funcional de alto rendimiento para seleccionar anticuerpos neutralizantes con amplitud y potencia sin precedentes. Por lo tanto, la memoria descriptiva muestra otros anticuerpos ampliamente neutralizantes y potentes que pueden desarrollarse usando los mismos métodos. En particular, la memoria descriptiva muestra anticuerpos ampliamente neutralizantes, potentes, contra diferentes cepas del VIH, en las que los bNAb se unen escasamente con formas recombinantes de Env. En particular, la memoria descriptiva muestra dos anticuerpos neutralizantes, PG9 y PG16, con actividades neutralizantes amplias particularmente contra aislados no de clado B. La presente invención, sin embargo, se refiere específicamente a un anticuerpo anti VIH PG16 que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. Además, la memoria descriptiva muestra anticuerpos inducidos por vacuna de alta especificidad que proporcionan protección contra una serie diversa de los aislados más prevalentes de VIH en circulación en todo el mundo. La memoria descriptiva muestra anticuerpos con potencia de neutralización muy alta y amplia, tal como la mostrada por PG9 y PG16 *in vitro*, que proporciona protección a concentraciones en suero relativamente modestas, y se generan por vacunación a diferencia de los NAb amplios conocidos en la técnica. La memoria descriptiva muestra inmunógenos que pueden diseñarse que centran la respuesta inmunitaria en regiones conservadas de bucles variables en el contexto del pico trimérico de la subunidad gp120 de la proteína Env.

La invención también se refiere a la caracterización del epítopo al que se une el anticuerpo de las invenciones y el

uso de ese epítopo en la inducción de una respuesta inmunitaria.

La invención también se refiere a diversos métodos y usos que implican el anticuerpo de la invención y los epítopos con los que se une. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención puede usarse como producto terapéutico. En algunos aspectos, el anticuerpo monoclonal se usa para terapia adyuvante. La terapia adyuvante se refiere al tratamiento con los anticuerpos monoclonales terapéuticos, en el que la terapia adyuvante se administra después del tratamiento primario para aumentar las posibilidades de una cura o reducir el riesgo estadístico de recaída.

La invención proporciona un nuevo anticuerpo monoclonal que tiene potencia particularmente alta en la neutralización del VIH. La invención también proporciona fragmentos de este anticuerpo monoclonal, particularmente fragmentos que conservan la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos, por ejemplo que conservan al menos una región determinante de complementariedad (CDR) específica para proteínas de VIH. En esta memoria descriptiva, por “alta potencia en la neutralización del VIH” se entiende que la molécula de anticuerpo de la invención neutraliza VIH en un ensayo convencional a una concentración menor que los anticuerpos conocidos en la técnica.

Preferentemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención puede neutralizar a una concentración de 0,16 µg/ml o menor (es decir, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,016, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004 o menor), preferentemente 0,016 µg/ml o menor (una concentración de anticuerpo de 10^{-8} o menor, preferentemente 10^{-9} M o menor, preferentemente 10^{-10} M o menor, es decir, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M o menor). Esto significa que solamente se requieren concentraciones muy bajas de anticuerpo para 50 % de neutralización de un aislado clínico de VIH *in vitro*. La potencia puede medirse usando un ensayo de neutralización convencional como se describe en la técnica.

El anticuerpo de la invención es capaz de neutralizar VIH. Pueden producirse anticuerpos monoclonales por procedimientos conocidos, por ejemplo, como se describe en R. Kennet *et al*. en “Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines; Progress and Applications”. Plenum Press (Nueva York), 1984. Materiales y métodos adicionales aplicados se basan en procedimientos conocidos, por ejemplo, tales como los descritos en J. Virol. 67: 6642-6647, 1993.

Estos anticuerpos pueden usarse como agentes profilácticos o terapéuticos tras formulación apropiada, o como una herramienta de diagnóstico.

Un “anticuerpo neutralizante” es uno que puede neutralizar la capacidad de ese patógeno para iniciar y/o perpetuar una infección en un hospedador y/o en células diana *in vitro*. La invención proporciona un anticuerpo humano monoclonal neutralizante, en el que el anticuerpo reconoce un antígeno de VIH.

Los anticuerpos mostrados en la memoria descriptiva son anticuerpos monoclonales denominados en el presente documento 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14). El anticuerpo de acuerdo con la invención, sin embargo, es el nuevo anticuerpo monoclonal denominado en el presente documento 1443_C16 (PG16). Todos estos anticuerpos se aislaron inicialmente de muestras humanas y se producen por los cultivos de linfocitos B denominados 1443_C16, 1456_P20, 1460_G14, 1495_C14 o 1496_C09. Además, se ha mostrado que todos estos anticuerpos neutralizan VIH *in vitro*. Por ejemplo, se ha mostrado que PG9 y PG16 tienen actividad neutralizante de VIH potente, amplia.

Las CDR de las cadenas pesadas de anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente. De forma similar, las CDR de las cadenas ligeras de anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente. La posición de los aminoácidos de CDR se definen de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT como: CDR1 - posiciones de IMGT 27 a 38, CDR2 – posiciones de IMGT 56 a 65 y CDR3 - posiciones de IMGT 105 a 117. (Lefranc, M P. *et al*. 2003 IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable regions and Ig superfamily V-like domains. Dev Comp Immunol. 27(1): 55-77; Lefranc, M P. 1997. Unique database numbering system for immunogenetic analysis. Immunology Today, 18: 509; Lefranc, M P. 1999. The IMGT unique numbering for Immunoglobulins, T cell receptors and Ig-like domains. The Immunologist, 7: 132-136.)

Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR3 de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos se muestran en las Tablas 3A y 3B.

Un filograma es un diagrama ramificado (de árbol) que se supone que es una estimación de la filogenia, las longitudes de las ramas son proporcionales a la cantidad de cambio evolutivo inferido. Los diagramas en árbol de las cinco cadenas pesadas y las cinco cadenas ligeras se prepararon usando ClustalW (Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. y Higgins D. G. Bioinformatics 23(21): 2947-2948 (2007); Higgins DG *et al*. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680. (1994)) y se muestran en las Figuras 1A y 1B respectivamente.

Se determinaron las secuencias de los anticuerpos, incluyendo las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas Gamma y ligeras Kappa o Lambda de los anticuerpos designados 1496_C09 (PG9), 1443_C16

(PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14). Además, se determinó la secuencia de cada uno de los polinucleótidos que codifica las secuencias de anticuerpo. Se muestran posteriormente las secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas de las cadenas pesadas gamma y cadenas ligeras kappa, con los péptidos señal en el extremo N terminal (o extremo 5') y las regiones constantes en el extremo C terminal (o extremo 3') de las regiones variables, que se muestran en texto en negrita.

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1443_C16 (PG16): secuencia codificante de γ3 de 1443 C16 (región variable en negrita)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGCAACTCTGTTAAGAGTTGTGAAGTGTCAGGAACAACT
GGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTAGCGTCTGGAT
TCACGTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCA
CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACTCTTTATCTGCAATTCAGCAGCCTGAAAGTCGAAGACACGGCTATGTTCT
TCTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGC
TACTACAACTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCAC
CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 11)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1443_C16 (PG16):

CAGGAACAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTT
AGCGTCTGGATTCACGTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGG
AGTGGGTGGCACTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTTTATCTGCAATTCAGCAGCCTGAAAGTCGAAGACAC
GGCTATGTTCTTCTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATT
TTAATGACGGCTACTACAACTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCG
AGC (SEQ ID NO: 99)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada gamma de 1443_C16 (PG16): proteína expresada con región variable en negrita.

QEQLVESGGGVVQPGGSLRLSCLASGFTFHKYGMHWVRQAPGKGLEWVALISDDGMRKYHSDS
MWGRVTISRDNSKNTLYLQFSSLKVEDTAMFFCAREAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV
WGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 12)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1443_C16 (PG16): (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita y en cursiva)

QEQLVESGGGVVQPGGSLRLSCLA***SGFTFHKYGMH***WVRQAPGKGLEWVA***LISDDGMRKYHSDSMW***GRVTISRDNSKNTL
YLQFSSLKVEDTAMFFCAR***EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV***WGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 31)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1443_C16 (PG16):

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1443_C16 (PG16):

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera lambda de 1443_C16 (PG16): secuencia codificante de λ2 de 1443_C16 (región variable en negrita)

ATGGCCTGGGCTCTGCTATTCCTCACCCTCTTCACTCAGGGCACAGGGTCCTGGGGC**CAGTCTGCCCTGACTCAG**
CCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAATGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGA
TTTGACTCTGTCTCCTGGTACCAACAATCCCCAGGGAAAGCCCCCAAAGTCATGGTTTTTGATGTCAGTCATCGG
CCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAC
ATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTCTTCACTGACAGACAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAG
GTGACCGTTCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCC
AACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGC
AGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTAC
CTGAGCCTGACGCC
TGAGCAGTGGAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGC
CCCTACAGAATGTTCATAG (SEQ ID NO: 13)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera lambda de 1443_C16 (PG16):

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAATGGAACC
AGCAGTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTACCAACAATCCCCAGGGAAAGCCCCCAAAGTCATGGTT
TTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACACGGCCTCCCTG
ACCATCTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTCTTCACTGACAGACAGAAGCCATCGCATA
TTCGGCGGCGGGACCAAGGTGACCGTTCTA (SEQ ID NO: 100)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera lambda de 1443_C16 (PG16): proteína expresada con región variable en negrita.

QSALTQPASVSGSPGQTITISCNGTSSDVGGFDSVSWYQQSPGKAPKVMVFDVSHRPSGISNRFSGS
KSGNTASLTISGLHIEDEGDYFCSSLTDRSHRIFGGGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKAT
LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG
STVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 14)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera lamba de 1443_C16 (PG16): (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QSALTQPASVSGSPGQTITISC***NGTSSDVGGFDSVS***WYQQSPGKAPKVMVF***DVSHRPSG***ISNRFSGSKSGNTASLTISGLHIED
EGDYFC***SSLTDRSHRI***FGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 32)

CDR de Kabat de cadena ligera lambda de 1443_C16 (PG16):

CDR 1: NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

CDR de Chothia de cadena ligera lambda de 1443_C16 (PG16):

CDR 1: NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1456_P20 (PG20): secuencia codificante de γ1 de 1456_P20 (región variable en negrita)

ATGGACTGGATTTGGAGGTTCCTCTTTGTGGTGGCAGCAGCTACAGGTGTCCAGTCC**CAGGTCCGCCT**
GGTACAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGACGGTCTCCTGCCAGGCTTCTGGAG
GCACCTTCAGCAGTTATGCTTTCACCTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAGGTCTTGAGTGGTTGGGC
ATGGTCACCCCAATCTTTGGTGAGGCCAAGTACTCACAAAGATTCGAGGGCAGAGTCACCATCACCGC
GGACGAATCCACGAGCACAACCTCCATAGAATTGAGAGGCCTGACATCCGAAGACACGGCCATTTATT
ACTGTGCGCGAGATCGGCGCGCGGTTCCAATTGCCACGGACAACTGGTTAGACCCCTGGGGCCAGGGG
ACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA
GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG
TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA
CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTC
ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC
GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA
AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 15)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1456_P20 (PG20):

CAGGTCCGCCTGGTACAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGACGGTCTCCTGCCA
GGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGTTATGCTTTCACCTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAGGTCTTG
AGTGGTTGGGCATGGTCACCCCAATCTTTGGTGAGGCCAAGTACTCACAAAGATTCGAGGGCAGAGTC
ACCATCACCGCGGACGAATCCACGAGCACAACCTCCATAGAATTGAGAGGCCTGACATCCGAAGACAC
GGCCATTTATTACTGTGCGCGAGATCGGCGCGCGGTTCCAATTGCCACGGACAACTGGTTAGACCCCT
GGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 101)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada gamma de 1456_P20 (PG20): proteína expresada con región variable en negrita.

QVRLVQSGPEVKKPGSSVTVSCQASGGTFSSYAFTWVRQAPGQGLEWLGMVTPIFGEAKYSQRF
EGRVTITADESTSTTSIELRGLTSEDTAIYYCARDRRAVPIATDNWLDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 16)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1456_P20 (PG20): (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QVRLVQSGPEVKKPGSSVTVSCQA***SGGTFSSYAFT***WVRQAPGQGLEWLG***MVTPIFGEAKYSQRFE***GR
VTITADESTSTTSIELRGLTSEDTAIYYCARD***RRAVPIATDNWLDP***WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 33)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1456_P20 (PG20):

CDR 1: SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104)
CDR 2: MVTPIFGEAKYSQRFE (SEQ ID NO: 105)
CDR 3: RAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 102)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1456_P20 (PG20):

CDR 1: SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104)
CDR 2: MVTPIFGEAKYSQRFE (SEQ ID NO: 105)
CDR 3: RRAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 103)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera kappa de 1456_P20 (PG20): secuencia codificante de κ1 de 1456_P20 (región variable en negrita)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGT**GA**
CATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGCGACAGAGTCTCCATCACTTGCC
GGGCGAGTCAGACCATTAACAACTACTTAAATTGGTATCAACAGACACCCGGGAAAGCCCCTAAACTC
CTGATCTATGGTGCCTCCAATTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGCTCTGGGAC
AGACTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAGGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTT
TCAGTACTCCGAGGACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGATATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT
GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
AGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 17)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera kappa de 1456_P20 (PG20):

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGCGACAGAGTCTCCATCACTTG
CCGGGCGAGTCAGACCATTAACAACTACTTAAATTGGTATCAACAGACACCCGGGAAAGCCCCTAAAC
TCCTGATCTATGGTGCCTCCAATTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGCTCTGGG
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAGGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAG
TTTCAGTACTCCGAGGACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGATATTAAA (SEQ ID NO: 106)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa de 1456_P20 (PG20): proteína expresada con región variable en negrita.

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCRASQTINNYLNWYQQTPGKAPKLLIYGASNLQNGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFSTPRTFGQGTRLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 18)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera kappa de 1456_P20 (PG20): (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITC***RASQTINNYLN***WYQQTPGKAPKLLIY***GASNLQNG***VPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYC***QQSFSTPRT***FGQGTRLDIK (SEQ ID NO: 34)

CDR de Kabat de cadena ligera kappa de 1456_P20 (PG20):

CDR 1: RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107)
CDR 2: GASNLQNG (SEQ ID NO: 108)
CDR 3: QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42)

CDR de Chothia de cadena ligera kappa de 1456_P20 (PG20):

CDR 1: RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107)
CDR 2: GASNLQNG (SEQ ID NO: 108)
CDR 3: QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42)

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1460_G14 (PGG14): secuencia codificante de γ1 de 1460_G14 (región variable en negrita)

ATGGACTGGATTTGGAGGTTCCTCTTGGTGGTGGCAGCAGCTACAGGTGTCCAGTCC**CAGGTCCTGCT**
GGTGCAGTCTGGGACTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGTCAGGCTTCTGGAG
GCGCCTTCAGTAGTTATGCTTTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAGGGGCTTGAATGGATGGGC
ATGATCACCCCTGTCTTTGGTGAGACTAAATATGCACCGAGGTTCCAGGGCAGACTCACACTTACCGC
GGAAGAATCCTTGAGCACCACCTACATGGAATTGAGAAGCCTGACATCTGATGACACGGCCTTTTATT
ATTGTACGAGAGATCGGCGCGTAGTTCCAATGGCCACAGACAACTGGTTAGACCCCTGGGGCCAGGGG
ACGCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA
GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG
TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA
CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTC
ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC
GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA
AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 19)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1460_G14 (PGG14):

CAGGTCCTGCTGGTGCAGTCTGGGACTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGTCA
GGCTTCTGGAGGCGCCTTCAGTAGTTATGCTTTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAGGGGCTTG
AATGGATGGGCATGATCACCCCTGTCTTTGGTGAGACTAAATATGCACCGAGGTTCCAGGGCAGACTC
ACACTTACCGCGGAAGAATCCTTGAGCACCACCTACATGGAATTGAGAAGCCTGACATCTGATGACAC
GGCCTTTTATTATTGTACGAGAGATCGGCGCGTAGTTCCAATGGCCACAGACAACTGGTTAGACCCCT
GGGGCCAGGGGACGCTGGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 109)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada gamma de 1460_G14: proteína expresada con región variable en negrita.

QVLLVQSGTEVKKPGSSVKVSCQASGGAFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGMITPVFGETKYAPRFQGRLTLTAEESLSTTY
MELRSLTSDDTAFYYCTRDRRVVPMATDNWLDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 20)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1460_G14: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QVLLVQSGTEVKKPGSSVKVSCQA***<u>SGGAFSSYAFS</u>***WVRQAPGQGLEWMG***<u>MITPVFGETKYAPRFQ</u>***GRLTLTAEESLSTTYM
ELRSLTSDDTAFYYCTRD***<u>RRVVPMATDNWLDP</u>***WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 35)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1460_G14:

CDR 1: SGGAFSSYAFS (SEQ ID NO: 110)
CDR 2: MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 111)
CDR 3: RVVPMATDNWLDP (SEQ ID NO: 102)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1460_G14:

CDR 1: SGGAFSSYAFS (SEQ ID NO: 110)
CDR 2: MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 111)
CDR 3: RRVVPMATDNWLDP (SEQ ID NO: 103)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera kappa de 1460_G14 (PGG14): secuencia codificante de κ1 de 1460_G14 (región variable en negrita)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTCCTCTGGCTCCGAGGTGCCACATGT**GA**
CATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGGGTCACCGTCACTTGCC
GGGCGAGTCAGACCATACACACCTATTTAAATTGGTATCAGCAAATTCCAGGAAAAGCCCCTAAGCTC
CTGATCTATGGTGCCTCCACCTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGAC
AGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTCCAACCTGAGGACTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTT
ACAGTACCCCAAGGACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGATATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT
GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
AGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 21)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera kappa de 1460_G14 (PGG14):

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGGGTCACCGTCACTTG
CCGGGCGAGTCAGACCATACACACCTATTTAAATTGGTATCAGCAAATTCCAGGAAAAGCCCCTAAGC
TCCTGATCTATGGTGCCTCCACCTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTCCAACCTGAGGACTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAG
TTACAGTACCCCAAGGACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGATATTAAA (SEQ ID NO: 112)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa de 1460_G14: proteína expresada con región variable en negrita.

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTVTCRASQTIHTYLNWYQQIPGKAPKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFA
TYYCQQSYSTPRTFGQGTRLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera kappa de 1460_G14: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTVTC***RASQTIHTYLN***WYQQIPGKAPKLLIY***GASTLQSG***VPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATY
YC***QQSYSTPRT***FGQGTRLDIK (SEQ ID NO: 36)

CDR de Kabat de cadena ligera kappa de 1460_G14:

CDR 1: RASQTIHTYL (SEQ ID NO: 113)
CDR 2: GASTLQSG (SEQ ID NO: 114)
CDR 3: QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43)

CDR de Chothia de cadena ligera kappa de 1460_G14:

CDR 1: RASQTIHTYL (SEQ ID NO: 113)
CDR 2: GASTLQSG (SEQ ID NO: 114)
CDR 3: QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43)

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1495_C14 (PGC14): secuencia codificante de γ1 de 1495_C14 (región variable en negrita)

ATGGACTGGATTTGGAGGATCCTCCTCTTGGTGGCAGCAGCTACAGGCACCCTCGCC**GACGGCCACCT**
GGTTCAGTCTGGGGTTGAGGTGAAGAAGACTGGGGCTACAGTCAAAATCTCCTGCAAGGTTTCTGGAT
ACAGCTTCATCGACTACTACCTTCATTGGGTGCAACGGGCCCCTGGAAAAGGCCTTGAGTGGGTGGGA
CTTATTGATCCTGAAAATGGTGAGGCTCGATATGCAGAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATAATCGC
GGACACGTCTATAGATACAGGCTACATGGAAATGAGGAGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATT
TCTGTGCAGCAGGTGCCGTGGGGGCTGATTCCGGGAGCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACTCTG
GTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC
CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT

GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA
TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACAT
GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC
AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
TAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 23)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1495_C14 (PGC14):

GACGGCCACCTGGTTCAGTCTGGGGTTGAGGTGAAGAAGACTGGGGCTACAGTCAAAATCTCCTGCAA
GGTTTCTGGATACAGCTTCATCGACTACTACCTTCATTGGGTGCAACGGGCCCCTGGAAAAGGCCTTG
AGTGGGTGGGACTTATTGATCCTGAAAATGGTGAGGCTCGATATGCAGAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC
ACCATAATCGCGGACACGTCTATAGATACAGGCTACATGGAAATGAGGAGCCTGAAATCTGAGGACAC
GGCCGTGTATTTCTGTGCAGCAGGTGCCGTGGGGGCTGATTCCGGGAGCTGGTTCGACCCCTGGGGCC
AGGGAACTCTGGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 115)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada gamma de 1495_C14 (PGC14): proteína expresada con región variable en negrita.

DGHLVQSGVEVKKTGATVKISCKVSGYSFIDYYLHWVQRAPGKGLEWVGLIDPENGEARYAEKF
QGRVTIIADTSIDTGYMEMRSLKSEDTAVYFCAAGAVGADSGSWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1495_C14 (PGC14): (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

DGHLVQSGVEVKKTGATVKISCKV***SGYSFIDYYLH***WVQRAPGKGLEWVG***LIDPENGEARYAEKFQ***GRVTIIADTSIDTGYMEM
RSLKSEDTAVYFCAAG***AVGADSGSWFDP***WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 37)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1495_C14:

CDR 1: SGYSFIDYYLH (SEQ ID NO: 116)
CDR 2: LIDPENGEARYAEKFQ (SEQ ID NO: 117)
CDR 3: AVGADSGSWFDP (SEQ ID NO: 118)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1495_C14:

CDR 1: SGYSFIDYYLH (SEQ ID NO: 116)
CDR 2: LIDPENGEARYAEKFQ (SEQ ID NO: 117)
CDR 3: AVGADSGSWFDP (SEQ ID NO: 118)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera lambda de 1495_C14 (PGC14): secuencia codificante de λ3 de 1495_C14 (región variable en negrita)

ATGGCCTGGATCCCTCTCTTCCTCGGCGTCCTTGCTTACTGCACAGATTCCGTAGTC**TCCTATGAACT**
GACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGTTCTGGATCTAAAT
TGGGGGATAAATATGTTTCCTGGTATCAACTGAGGCCAGGCCAGTCCCCCATACTGGTCATGTATGAA
AATGACAGGCGGCCCTCCGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGTTCCAATTCTGGCGACACTGCCACTCT
GACCATCAGCGGGACCCAGGCTTTGGATGAGGCTGACTTCTACTGTCAGGCGTGGGAGACCACCACCA
CCACTTTTGTTTTCTTCGGCGGAGGGACCCAGCTGACCGTTCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCG
GTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAG
TGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG
AGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCT
GAGCAGTGGAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGAC
AGTGGCCCCTACAGAATGTTCATAG (SEQ ID NO: 25)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera lambda de 1495_C14 (PGC14):

TCCTATGAACTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGTTC
TGGATCTAAATTGGGGGATAAATATGTTTCCTGGTATCAACTGAGGCCAGGCCAGTCCCCCATACTGG
TCATGTATGAAAATGACAGGCGGCCCTCCGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGTTCCAATTCTGGCGAC
ACTGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTTTGGATGAGGCTGACTTCTACTGTCAGGCGTGGGA
GACCACCACCACCACTTTTGTTTTCTTCGGCGGAGGGACCCAGCTGACCGTTCTA (SEQ ID NO: 119)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera lambda de 1495_C14 (PGC14): proteína expresada con región variable en negrita.

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGSKLGDKYVSWYQLRPGQSPILVMYENDRRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQALDEA
DFYCQAWETTTTTFVFFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTP
SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 26)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera lambda de 1495_C14 (PGC14): (CDR de Kabat subrayada, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITC***SGSKLGDKYVS***WYQLRPGQSPILVMY***ENDRRPSG***IPERFSGSNSGDTATLTISGTQALDEADF
YC***QAWETTTTTFVF***FGGGTQLTVL (SEQ ID NO: 38)

CDR de Kabat de cadena ligera lambda de 1495_C14 (PGC14):

CDR 1: SGSKLGDKYVS (SEQ ID NO: 120)
CDR 2: ENDRRPSG (SEQ ID NO: 121)
CDR 3: QAWETTTTTFVF (SEQ ID NO: 44)

CDR de Chothia de cadena ligera lambda de 1495_C14 (PGC14):

CDR 1: SGSKLGDKYVS (SEQ ID NO: 120)
CDR 2: ENDRRPSG (SEQ ID NO: 121)
CDR 3: QAWETTTTTFVF (SEQ ID NO: 44)

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1496_C09 (PG9): secuencia codificante de γ3 de 1496_C09 (región variable en negrita)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTTTCTTAAGAGGTGTCCAGTGT**CAGCGATTAGT**
GGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGTCGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCCGGATTCG
ACTTCAGTAGACAAGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTT
ATTAAATATGATGGAAGTGAGAAATATCATGCTGACTCCGTATGGGGCCGACTCAGCATCTCCAGAGA
CAATTCCAAGGATACGCTTTATCTCCAAATGAATAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTACATATTTTT

GTGTGAGAGAGGCTGGTGGGCCCGACTACCGTAATGGGTACAACTATTACGATTTCTATGATGGTTAT
TATAACTACCACTATATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAA
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC
CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG
TGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC
CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 27)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1496_C09 (PG9):

CAGCGATTAGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGTCGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCCGGA
TTCGACTTCAGTAGACAAGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATT
AAATATGATGGAAGTGAGAAATATCATGCTGACTCCGTATGGGGCCGACTCAGCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
GATACGCTTTATCTCCAAATGAATAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTACATATTTTTGTGTGAGAGAGGCTGGT
GGGCCCGACTACCGTAATGGGTACAACTATTACGATTTCTATGATGGTTATTATAACTACCACTATATGGACGTC
TGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 122)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada gamma de 1496_C09 (PG9): proteína expresada con región variable en negrita.

QRLVESGGGVVQPGSSLRLSCAASGFDFSRQGMHWVRQAPGQGLEWVAFIKYDGSEKYHADSVWGRLSISRDNSKDTLY
LQMNSLRVEDTATYFCVREAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 28)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1496_C09 (PG9): (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QRLVESGGGVVQPGSSLRLSCAA***SGFDFSRQGMH***WVRQAPGQGLEWVA***FIKYDGSEKYHADSVW***GRLSISRDNSKDTLYL
QMNSLRVEDTATYFCVR***EAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDV***WGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 39)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1496_C09 (PG9):

CDR 1: SGFDFSRQGMH (SEQ ID NO: 123)
CDR 2: FIKYDGSEKYHADSVW (SEQ ID NO: 124)
CDR 3: EAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 7)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1496_C09 (PG9):

CDR 1: SGFDFSRQGMH (SEQ ID NO: 123)
CDR 2: FIKYDGSEKYHADSVW (SEQ ID NO: 124)
CDR 3: EAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 7)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera lambda de 1496_C09 (PG9): secuencia codificante de λ2 de 1496_C09 (región variable en negrita)

ATGGCCTGGGCTCTGCTTTTCCTCACCCTCCTCACTCAGGGCACAGGGTCCTGGGCC**CAGTCTGCCCT**
GACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCAATGGAACCAGCA
ATGATGTTGGTGGCTATGAATCTGTCTCCTGGTACCAACAACATCCCGGCAAAGCCCCCAAAGTCGTG
ATTTATGATGTCAGTAAACGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACAC
GGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGGTGACTATTACTGCAAGTCTCTGACAA
GCACGAGACGTCGGGTTTTCGGCACTGGGACCAAGCTGACCGTTCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCC
TCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCAT
AAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAG
TGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACG
CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA
GACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATAG (SEQ ID NO: 29)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera lambda de 1496_C09 (PG9):

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCAA
TGGAACCAGCAATGATGTTGGTGGCTATGAATCTGTCTCCTGGTACCAACAACATCCCGGCAAAGCCC
CCAAAGTCGTGATTTATGATGTCAGTAAACGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAG
TCCGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGGTGACTATTACTGCAA
GTCTCTGACAAGCACGAGACGTCGGGTTTTCGGCACTGGGACCAAGCTGACCGTTCTA (SEQ ID NO: 125)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera lambda de 1496_C09 (PG9): proteína expresada con región variable en negrita.

QSALTQPASVSGSPGQSITISCNGTSNDVGGYESVSWYQQHPGKAPKVVIYDVSKRPSGVSNRFSG
SKSGNTASLTISGLQAEDEGDYYCKSLTSTRRRVFGTGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK
ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTH
EGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 30)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera lambda de 1496_C09 (PG9): (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QSALTQPASVSGSPGQSITISC***NGTSNDVGGYESVS***WYQQHPGKAPKVVIY***DVSKRPSG***VSNRFSGSKS
GNTASLTISGLQAEDEGDYYC***KSLTSTRRRV***FGTGTKLTVL (SEQ ID NO: 40)

CDR de Kabat de cadena ligera lambda de 1496_C09 (PG9):

CDR 1: NGTSNDVGGYESVS (SEQ ID NO: 126)
CDR 2: DVSKRPSG (SEQ ID NO: 127)
CDR 3: KSLTSTRRRV (SEQ ID NO: 45)

CDR de Chothia de cadena ligera lambda de 1496_C09 (PG9):

CDR 1: NGTSNDVGGYESVS (SEQ ID NO: 126)
CDR 2: DVSKRPSG (SEQ ID NO: 127)
CDR 3: KSLTSTRRRV (SEQ ID NO: 45)

El anticuerpo PG16 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 31), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 99 y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 32) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 100.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo PG16 tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y Chothia: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEC ID NO: 89) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo PG16 tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y Chothia: NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

El anticuerpo PG20 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 33), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 101 y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 34) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 106.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo PG20 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104), MVTPIFGEAKYSQRFE (SEQ ID NO: 105) y RAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 102). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo PG20 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107), GASNLQNG (SEQ ID NO: 108) y QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42).

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo PG20 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104), MVTPIFGEAKAKQRFE (SEQ ID NO: 105) y RRAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 103). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo PG20 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107), GASNLQNG (SEQ ID NO: 108) y QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42).

El anticuerpo PGG14 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 35), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 109 y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 36) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 112.

Las CDR de la cadena pesada del anticuerpo PGG14 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: SGGAFSSYAFS (SEQ ID NO: 110) MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 111) y RVVPMATDNWLDP (SEQ ID NO: 113). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo PGG14 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: RAGASTLQSG (SEQ ID NO: 114) y QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43).

Las CDR de la cadena pesada del anticuerpo PGG14 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: SSYAFS (SEQ ID NO: 110), MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 111), RRVVPMATDNWLDP (SEQ ID NO: 103). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo PGG14 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: RASQ (SEQ ID NO: 113), GASTLQSG (SEQ ID NO: 114) y QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43).

El anticuerpo PGC14 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 37), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 115 y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 38) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 119.

Las CDR de la cadena pesada del anticuerpo PGC14 tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y Chothia: SGYSFIDYYLH (SEQ ID NO: 116) LIDPENGEARYAEKFQ (SEQ ID NO: 117) y AVGADSGSWF (SEQ ID NO: 118). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo PGC14 tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y Chothia SGSKLGDKYVS (SEQ ID NO: 120), ENDRRPSG (SEQ ID NO: 121) y QAWETTTTTFVF (SEQ ID NO: 44).

El anticuerpo PG9 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 39), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 122 y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 40) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 125.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo PG9 tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y Chothia SGFDFSRQGMH (SEQ ID NO: 123) FIKYDGSEKYHADSVW (SEQ ID NO: 124) y EAGGPDYRNGYNYHYMDV (SEQ ID NO: 7). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo PG9 tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y Chothia: NGTSNDVGGYESVS (SEQ ID NO: 126), DVSKRPSG (SEQ ID NO: 127) y KSLTSTRRRV (SEQ ID NO: 45).

Tabla 6A. Alineamiento de proteína de región variable de cadena pesada

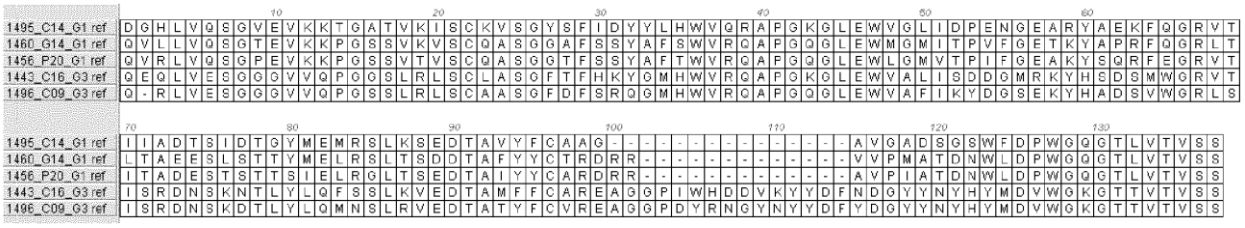
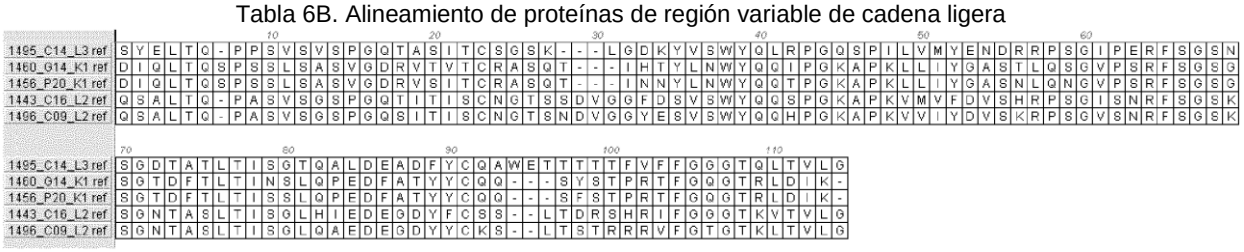


Tabla 6B. Alineamiento de proteínas de región variable de cadena ligera



Se determinaron las secuencias de clones hermanos para el anticuerpo monoclonal humano 1443_C16 (PG16),

incluyendo las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas gamma y ligeras kappa o lambda. Además, se determinó la secuencia de cada uno de los polinucleótidos que codificaban las secuencias de anticuerpo. Se muestran a continuación las secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas de las cadenas pesadas gamma y cadenas ligeras kappa con los péptidos señal en el extremo N terminal (o extremo 5') y las regiones constantes en el extremo C terminal (o extremo 3') de las regiones variables, que se muestran en texto en negrita.

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1469_M23: secuencia codificante de γ3 de 1469_M23 (región variable en negrita)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGCAACTCTGTTAAGAGTTGTGAAGTGT**CAGGAAAAACT**
GGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTAGCGTCTGGAT
TCACCTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCA
CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACTCTATATCTGCAATTCaGCAGCCTGAAAGTCGAAGACACGGCTATGTTCT
TCTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGC
TACTACAACTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGtCTCCTCAGCGTCGAC
CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTCTGGCACCATCATCCAAGTCGACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 138)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1469_M23:

CAGGAAAAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTT
AGCGTCTGGATTCACCTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGG
AGTGGGTGGCACTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTATATCTGCAATTCaGCAGCCTGAAAGTCGAAGACAC
GGCTATGTTCTTCTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATT
TTAATGACGGCTACTACAACTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGtCTCC
TCA (SEQ ID NO: 128)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada gamma de 1469_M23: proteína expresada con región variable en negrita.

QEKLVESGGGVVQPGGSLRLSCLASGFTFHKYGMHWVRQAPGKGLEWVALISDDGMR
KYHSDSMWGRVTISRDNSKNTLYLQFSSLKVEDTAMFFCAREAGGPIWHDDVKYYDFN
DGYYNYHYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 139)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1469_M23: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QEKLVESGGGVVQPGGSLRLSCLA***SGFTFHKYGMH***WVRQAPGKGLEWVA***LISDDGMRKYH SDSMW***GRVTISRDNSKNTLYLQFSSLKVEDTAMFFCAR***EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNY HYMDV***WGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 140)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1469_M23:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1469_M23:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de nucleótido de cadena ligera lambda de 1469_M23: secuencia codificante de λ2 de 1469_M23 (región variable en negrita)

ATGGCCTGGGCTCTGCTATTCCTCACCCTCTTCACTCAGGGCACAGGGTCCTGGGGC**CAGTCTGCCCT GACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAATGGAACCAGAA GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTACCAACAATCCCCAGGGAGAGCCCCCAAAGTCATG GTTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACAC GGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTCTTCACTGACAG ACAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGCTGACCGTTCTA**GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCC TCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCAT AAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAG TGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATAG (SEQ ID NO: 141)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera lambda de 1469_M23:

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAA TGGAACCAGAAGTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTACCAACAATCCCCAGGGAGAGCCC CCAAAGTCATGGTTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAG TCCGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTC TTCACTGACAGACAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGCTGACCGTTCTA (SEQ ID NO: 129)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera lambda de 1469_M23: proteína expresada con región variable en negrita.

QSALTQPASVSGSPGQTITISCNGTRSDVGGFDSVSWYQQSPGRAPKVMVFDVSHRPSGI SNRFSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFCSSLTDRSHRIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 142)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada lambda de 1469_M23: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QSALTQPASVSGSPGQTITISC***NGTRSDVGGFDSVS***WYQQSPGRAPKVMVF***DVSHRPSG***ISNR FSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFC***SSLTDRSHRI***FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 96)

CDR de Kabat de cadena ligera lambda de 1469_M23:

CDR 1: NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

CDR de Chothia de cadena ligera lambda de 1469_M23:

CDR 1: NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1456_A12: secuencia codificante de γ3 de 1456_A12 (región variable en negrita)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGCAACTCTGTTAAGAGTTGTGAAGTGT**CACGAACAACT**
GGTGGAGGCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTAGCGTCTGGAT
TCACGTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCA
CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACTCTTTATCTGCAATTCAGCAGCCTGAGAGTCGAAGACACGGCTATGTTCT
TCTGTGCGAGAGAGGCCGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGC
TACTACAACTATCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCAAGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGAC
CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTCTGGCACCATCATCCAAGTCGACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 46)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1456_A12:

CACGAACAACTGGTGGAGGCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTT
AGCGTCTGGATTCACGTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGG
AGTGGGTGGCACTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTTTATCTGCAATTCAGCAGCCTGAGAGTCGAAGACAC
GGCTATGTTCTTCTGTGCGAGAGAGGCCGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATT
TTAATGACGGCTACTACAACTATCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCAAGGTCACCGTCTCC
TCA (SEQ ID NO: 130)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada lambda de 1456_A12: proteína expresada con región variable en negrita.

HEQLVEAGGGVVQPGGSLRLSCLASGFTFHKYGMHWVRQAPGKGLEWVALISDDGM
RKYHSDSMWGRVTISRDNSKNTLYLQFSSLRVEDTAMFFCAREAGGPIWHDDVKYYDF
NDGYYNYHYMDVWGKGTKVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1456_A12: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

HEQLVEAGGGVVQPGGSLRLSCLA***SGFTFHKYGMH***WVRQAPGKGLEWVA***LISDDGMRKY HSDSMW***GRVTISRDNSKNTLYLQFSSLRVEDTAMFFCAR***EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYN YHYMDV***WGKGTKVTVSS (SEQ ID NO: 48)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1456_A12:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1456_A12:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera lambda de 1456_A12: secuencia codificante de λ2 de 1456_A12 (región variable en negrita)

ATGGCCTGGGCTTGCTATTCCTCACCCTCTTCACTCAGGGCACAGGGTCCTGGGGC**CAGTCTGCCCTG ACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAATGGAACCAGCCG TGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTATCAACAATCCCCAGGGAAAGCCCCCAAAGTCATGG TTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATGTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACACG GCCTCCCTGACCATTTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTCTTCATTGACAGA CAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGCTGACCGTTCTA**GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCT CGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATA AGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGT GGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGC CTGAGCAGTGGAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAG ACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATAG (SEQ ID NO: 49)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera lambda de 1456_A12:

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAA TGGAACCAGCCGTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTATCAACAATCCCCAGGGAAAGCCC CCAAAGTCATGGTTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATGTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAG TCCGGCAACACGGCCTCCCTGACCATTTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTC TTCATTGACAGACAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGCTGACCGTTCTA (SEQ ID NO: 131)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera lambda de 1456_A12: proteína expresada con región variable en negrita.

QSALTQPASVSGSPGQTITISCNGTSRDVGGFDSVSWYQQSPGKAPKVMVFDVSHRPSG MSNRFSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFCSSLTDRSHRIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 50)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera lambda de 1456_A12: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QSALTQPASVSGSPGQTITISC***NGTSRDVGGFDSVS***WYQQSPGKAPKVMVF***DVSHRPSG***MSN RFSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFC***SSLTDRSHRI***FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 51)

CDR de Kabat de cadena ligera lambda de 1456_A12:

CDR 1: NGTSRDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 93)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

CDR de Chothia de cadena ligera lambda de 1456_A12:

CDR 1: NGTSRDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 93)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1503_H05: secuencia codificante de γ3 de 1503_H05 (región variable en negrita)

ATGGAGTTTGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGCAACTCTGTTAAGAGTTGTGAAGTGT**CAGGAAAAACTG**
GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTAGCGTCTGGATT
CACCTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCAC
TCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTCACCATCTCCAGA
GACAATTCCAAGAACACTTTATATCTGCAATTCAGCAGCCTGAAAGTCGAAGACACGGCTATGTTCTT
CTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCT
ACTACAATTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCATTGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCTCTGGCACCATCATCCAAGTCGACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG
GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG
TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 52)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1503_H05:

CAGGAAAAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTT
AGCGTCTGGATTCACCTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGG
AGTGGGTGGCACTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTTTATATCTGCAATTCAGCAGCCTGAAAGTCGAAGACAC
GGCTATGTTCTTCTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATT
TTAATGACGGCTACTACAATTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCATTGTCACCGTCTCC
TCA (SEQ ID NO: 132)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada gamma de 1503_H05: proteína expresada con región variable en negrita.

QEKLVESGGGVVQPGGSLRLSCLASGFTFHKYGMHWVRQAPGKGLEWVALISDDGMR
KYHSDSMWGRVTISRDNSKNTLYLQFSSLKVEDTAMFFCAREAGGPIWHDDVKYYDFN
DGYYNYHYMDVWGKGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53).

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1503_H05: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QEKLVESGGGVVQPGGSLRLSCLA***SGFTFHKYGMH***WVRQAPGKGLEWVA***LISDDGMRKYH SDSMW***GRVTISRDNSKNTLYLQFSSLKVEDTAMFFCAR***EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNY HYMDV***WGKGTIVTVSS (SEQ ID NO: 54)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1503_H05:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1503_H05:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera lambda de 1503_H05: secuencia codificante de λ2 de 1503_H05 (región variable en negrita)

ATGGCCTGGGCTTGCTATTCCTCACCCTCTTCACTCAGGGCACAGGGTCCTGGGGC**CAGTCTGCCCTG ACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAATGGAACCAGAAG TGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTACCAACAATCCCCAGGGAAAGCCCCCAAAGTCATGG TTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACACG GCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTCTTCACTGACAGA CAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGGTGACCGTTCTA**GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCT CGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATA AGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGT GGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGC CTGAGCAGTGGAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAG ACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATAG (SEQ ID NO: 55)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera lambda de 1503_H05:

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAA TGGAACCAGAAGTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTACCAACAATCCCCAGGGAAAGCCC CCAAAGTCATGGTTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAG TCCGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTC TTCACTGACAGACAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGGTGACCGTTCTA (SEQ ID NO: 133)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera lambda de 1503_H05: proteína expresada con región variable en negrita.

QSALTQPASVSGSPGQTITISCNGTRSDVGGFDSVSWYQQSPGKAPKVMVFDVSHRPSGI SNRFSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFCSSLTDRSHRIFGGGTKVTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 56)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera lambda de 1503_H05: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QSALTQPASVSGSPGQTITISC***NGTRSDVGGFDSVS***WYQQSPGKAPKVMVF***DVSHRPSG***ISNR FSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFC***SSLTDRSHRI***FGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 57)

CDR de Kabat de cadena ligera lambda de 1503_H05:

CDR 1: NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

CDR de Chothia de cadena ligera lambda de 1503_H05:

CDR 1: NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1489_I13: secuencia codificante de γ3 de 1489_I13 (región variable en negrita)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGCAACTCTGTTAAGAGTTGTGAAGTGT**CAGGAACAACT**
GTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTAGCGTCTGGAT
TCACGTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCA
CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAAACTCCATGTGGGGCCGAGTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACTCTTTATCTGCAATTCAGCAGCCTGAAAGTCGAAGACACGGCTATGTTCT
TCTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGC
TACTACAACTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGAC
CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTCTGGCACCATCATCCAAGTCGACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 58)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1489_I13:

CAGGAACAACTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTT
AGCGTCTGGATTCACGTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGG
AGTGGGTGGCACTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAAACTCCATGTGGGGCCGAGTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTTTATCTGCAATTCAGCAGCCTGAAAGTCGAAGACAC
GGCTATGTTCTTCTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATT
TTAATGACGGCTACTACAACTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA (SEQ ID NO: 134)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada gamma de 1489_I13: proteína expresada con región variable en negrita.

QEQLLESGGGVVQPGGSLRLSCLASGFTFHKYGMHWVRQAPGKGLEWVALISDDGMR
KYHSNSMWGRVTISRDNSKNTLYLQFSSLKVEDTAMFFCAREAGGPIWHDDVKYYDFN
DGYYNYHYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 59)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1489_I13: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QEQLLESGGGVVQPGGSLRLSCLA***SGFTFHKYGMH***WVRQAPGKGLEWVA***LISDDGMRKYH SNSMW***GRVTISRDNSKNTLYLQFSSLKVEDTAMFFCAR***EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNY HYMDV***WGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 60)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1489_I13:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSNSMW (SEQ ID NO: 98)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1489_I13:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSNSMW (SEQ ID NO: 98)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera lambda de 1489_I13: secuencia codificante de λ2 de 1489_I13 (región variable en negrita)

ATGGCCTGGGCTCTGCTATTCCTCACCCTCTTCACTCAGGGCACAGGGTCCCGGGGC**CAGTCTGCCCT GACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAATGGAACCAGCA GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTATCAACAATCCCCAGGGAAAGCCCCCAAAGTCATG GTTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACAC GGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTCTTCACTGACAG ACAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGGTGACCGTTCTA**GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCC TCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCAT AAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAG TGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATAG (SEQ ID NO: 61)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera lambda de 1489_I13:

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAA TGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTATCAACAATCCCCAGGGAAAGCCC CCAAAGTCATGGTTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAG TCCGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTC TTCACTGACAGACAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGGTGACCGTTCTA (SEQ ID NO: 135)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada lambda de 1489_I13: proteína expresada con región variable en negrita.

QSALTQPASVSGSPGQTITISCNGTSSDVGGFDSVSWYQQSPGKAPKVMVFDVSHRPSGI SNRFSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFCSSLTDRSHRIFGGGTKVTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 14)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera lambda de 1489_I13: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva).

QSALTQPASVSGSPGQTITISC***NGTSSDVGGFDSVS***WYQQSPGKAPKVMVF***DVSHRPSG***ISNR FSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFC***SSLTDRSHRI***FGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 32)

CDR de Kabat de cadena ligera lambda de 1489_I13:

CDR 1: NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

CDR de Chothia de cadena ligera lambda de 1489_I13:

CDR 1: NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada gamma de 1480_I08: secuencia codificante de γ3 de 1480_I08 (región variable en negrita)

ATGGAGTTTGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGCAACTCTGTTAAGAGTTGTGAAGTGT**CAGGAACAACTG**
GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTAGCGTCTGGATT
CACGTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCAC
TCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTCACCATCTCCAGA
GACAATTCCAAGAACACTCTTTATCTGCAATTCAGCAGCCTGAAAGTCGAAGACACGGCTATGTTCTT
CTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCT
ACTACAACTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCTCTGGCACCATCATCCAAGTCGACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG
GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG
TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 64)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada gamma de 1480_I08:

CAGGAACAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTT
AGCGTCTGGATTCACGTTTCACAAATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGG
AGTGGGTGGCACTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCAGACTCCATGTGGGGCCGAGTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTTTATCTGCAATTCAGCAGCCTGAAAGTCGAAGACAC
GGCTATGTTCTTCTGTGCGAGAGAGGCTGGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATT
TTAATGACGGCTACTACAACTACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA (SEQ ID NO: 136)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada gamma de 1480_I08: proteína expresada con región variable en negrita.

QEQLVESGGGVVQPGGSLRLSCLASGFTFHKYGMHWVRQAPGKGLEWVALISDDGMR
KYHSDSMWGRVTISRDNSKNTLYLQFSSLKVEDTAMFFCAREAGGPIWHDDVKYYDFN
DGYYNYHYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 65)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada gamma de 1480_I08: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QEQLVESGGGVVQPGGSLRLSCLA***SGFTFHKYGMH***WVRQAPGKGLEWVA***LISDDGMRKYHSDSMW***GRVTISR DNSKNTLYLQFSSLKVEDTAMFFCAR***EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV***WGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 31)

CDR de Kabat de cadena pesada gamma de 1480_I08:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

CDR de Chothia de cadena pesada gamma de 1480_I08:

CDR 1: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
CDR 2: LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89)
CDR 3: EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera lambda de 1480_I08: secuencia codificante de λ2 de 1480_I08 (región variable en negrita)

ATGGCCTGGGCTCTGCTATTCGTCACCCTCCTCACTCAGGGCACAGGGTCCTGGGGC**CAGTCTGCCCT GACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAATGGAACCAGCA GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTATCAACAATCCCCAGGGAAAGCCCCCAAAGTCATG GTTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACAC GGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTCTTCACTGACAG ACAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGGTGACCGTTCTA**GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCC TCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCAT AAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAG TGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATAG (SEQ ID NO: 67)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera lambda de 1480_I08:

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGACGATCACCATCTCCTGCAA TGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCCTGGTATCAACAATCCCCAGGGAAAGCCC CCAAAGTCATGGTTTTTGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGTATCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAG TCCGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCACATTGAGGACGAGGGCGATTATTTCTGCTC TTCACTGACAGACAGAAGCCATCGCATATTCGGCGGCGGGACCAAGGTGACCGTTCTA (SEQ ID NO: 137)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada lambda de 1480_I08: proteína expresada con región variable en negrita.

QSALTQPASVSGSPGQTITISCNGTSSDVGGFDSVSWYQQSPGKAPKVMVFDVSHRPSGI SNRFSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFCSSLTDRSHRIFGGGTKVTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 14)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera lambda de 1480_I08: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en negrita en cursiva)

QSALTQPASVSGSPGQTITISC***NGTSSDVGGFDSVS***WYQQSPGKAPKVMVF***DVSHRPSG***ISNR FSGSKSGNTASLTISGLHIEDEGDYFC***SSLTDRSHRI***FGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 32)

CDR de Kabat de cadena ligera lambda de 1480_I08:

CDR 1: NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

CDR de Chothia de cadena ligera lambda de 1480_I08:

CDR 1: NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
CDR 2: DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
CDR 3: SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

El anticuerpo 1469_M23 (PG16) incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 139), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 128, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 142) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 129.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1469_M23 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88) LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1469_M23 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

El anticuerpo 1469_A12 (PG16) incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 47), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 130, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 50) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 131.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1469_A12 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1469_A12 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: NGTSRDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 93), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

El anticuerpo 1503_H05 (PG16) incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 53), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 132, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 56) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 133.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1503_H05 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1503_H05 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

El anticuerpo 1489_I13 (PG16) incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 59), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 134, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 14) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 135.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1489_I13 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSNSMW (SEQ ID NO: 98) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1489_I13 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

El anticuerpo 1480_I08 (PG16) incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 65), codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 136, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 14) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 137.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1480_I08 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89) y EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1480_I08 (PG16) tienen las siguientes secuencias según las definiciones de Kabat y de Chothia: NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95) y SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41).

En un aspecto de la memoria descriptiva, un anticuerpo contiene una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, 16, 20, 24, 28, 139, 47, 53, 59 o 65 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 18, 22, 26, 30, 142, 50 o 56. Como alternativa, un anticuerpo contiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 140, 48, 54 o 60 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 96, 51 o 57.

En otro aspecto de la memoria descriptiva, un anticuerpo contiene una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11, 15, 19, 23, 27, 138, 46, 52, 58 o 64 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13, 17, 21, 25, 29, 141, 49, 55, 61 o 67. Como alternativa, un anticuerpo contiene una región variable de cadena

pesada que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 99, 101, 109, 115, 122, 128, 130, 132, 134 o 136 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 100, 106, 112, 119, 125, 129, 131, 133, 135 o 137. Como alternativa, un anticuerpo contiene una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11, 15, 19, 23, 27, 138, 46, 52, 58 o 64, que contiene una mutación silenciosa o degradada, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13, 17, 21, 25, 29, 141, 49, 55, 61 o 67, que contiene una mutación silenciosa o degradada. Las mutaciones silenciosas y degradadas alteran la secuencia de ácido nucleico, pero no alteran la secuencia de aminoácidos resultante.

Por ejemplo, las tres CDR de cadena pesada incluyen una secuencia de aminoácidos de al menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más identidad con la secuencia de aminoácidos de SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89), EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6), SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104), MVTPIFGEAKYSQRFE (SEQ ID NO: 105), RAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 102), SGGAFSSYAFS (SEQ ID NO: 110), MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 111), SGYSFIDYYLH (SEQ ID NO: 116), LIDPENGEARYAEKFQ (SEQ ID NO: 117), AVGADSGSWFDP (SEQ ID NO: 118), SGFDFSRQGMH (SEQ ID NO: 123), FIKYDGSEKYHADSVW (SEQ ID NO: 124), EAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 7), LISDDGMRKYHSNSMW (SEQ ID NO: 98) (como se determina por el método de Kabat) o SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88), LISDDGMRKYHSDSMW (SEQ ID NO: 89), EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6), SGGTFSSYAFT (SEQ ID NO: 104), MVTPIFGEAKYSQRFE (SEQ ID NO: 105), RRAVPIATDNWLDP (SEQ ID NO: 103), SGGAFSSYAFS (SEQ ID NO: 110), MITPVFGETKYAPRFQ (SEQ ID NO: 111), SGYSFIDYYLH (SEQ ID NO: 116), LIDPENGEARYAEKFQ (SEQ ID NO: 117), AVGADSGSWFDP (SEQ ID NO: 118), SGFDFSRQGMH (SEQ ID NO: 123), FIKYDGSEKYHADSVW (SEQ ID NO: 124), EAGGPDYRNGYNYYDFYDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 7), LISDDGMRKYHSNSMW (SEQ ID NO: 98) (como se determina por el método de Chothia) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos de al menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad con la secuencia de aminoácidos de NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95), SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41), RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107), GASNLQNG (SEQ ID NO: 108), QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42), RASQTIHTYL (SEQ ID NO: 113), GASTLQSG (SEQ ID NO: 114), QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43), SGSKLGDKYVS (SEQ ID NO: 120), ENDRRPSG (SEQ ID NO: 121), QAWETTTTTFVF (SEQ ID NO: 44), NGTSNDVGGYESVS (SEQ ID NO: 126), DVSKRPSG (SEQ ID NO: 127), KSLTSTRRRV (SEQ ID NO: 45), NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92), NGTSRDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 93) (como se determina por el método de Kabat) o NGTSSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97), DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95), SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41), RASQTINNYLN (SEQ ID NO: 107), GASNLQNG (SEQ ID NO: 108), QQSFSTPRT (SEQ ID NO: 42), RASQTIHTYL (SEQ ID NO: 113), GASTLQSG (SEQ ID NO: 114), QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 43), SGSKLGDKYVS (SEQ ID NO: 120), ENDRRPSG (SEQ ID NO: 121), QAWETTTTTFVF (SEQ ID NO: 44), NGTSNDVGGYESVS (SEQ ID NO: 126), DVSKRPSG (SEQ ID NO: 127), KSLTSTRRRV (SEQ ID NO: 45), NGTRSDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92), NGTSRDVGGFDSVS (SEQ ID NO: 93) (como se determina por el método de Chothia).

La cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti VIH se obtiene de un gen variable (V) de línea germinal tal como, por ejemplo, el gen de línea germinal de IGHV1 o IGHV3.

En un aspecto de la memoria descriptiva, los anticuerpos anti VIH incluyen una región de cadena pesada variable (V_H) codificada por una secuencia génica de línea germinal de IGHV1 o IGHV3 humana. Se muestran secuencias génicas de línea germinal IGHV1, por ejemplo, en los números de Referencia L22582, X27506, X92340, M83132, X67905, L22583, Z29978, Z14309, Z14307, Z14300, Z14296 y Z14301. Se muestran secuencias génicas de línea germinal de IGHV3, por ejemplo, en los números de Referencia AB019439, M99665, M77305, M77335 y M77334. Los anticuerpos anti VIH de la memoria descriptiva incluyen una región V_H que está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 % homóloga de la secuencia génica de línea germinal de IGHV1 o IGHV3. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 % homóloga de la secuencia génica de línea germinal IGHV1 o IGHV3 y, más preferentemente, al menos 98 %, 99 % homóloga de la secuencia génica de línea germinal de IGHV1 o IGHV3. La región V_H del anticuerpo anti VIH es al menos 80 % homóloga de la secuencia de aminoácidos de la región V_H codificada por la secuencia génica de línea germinal de V_H de IGHV1 o IGHV3. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de región V_H del anticuerpo anti VIH es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 % homóloga de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia génica de línea germinal de IGHV1 o IGHV3 y, más preferentemente, al menos 98 %, 99 % homóloga de la secuencia codificada por la secuencia génica de línea germinal de IGHV1 o IGHV3.

La cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti VIH se obtiene de un gen variable (V) de línea germinal tal como, por ejemplo, el gen de línea germinal de IGLV2, IGLV3 o IGKV1.

En otro aspecto de la memoria descriptiva, los anticuerpos anti VIH también incluyen una región de cadena ligera variable (V_L) codificada por una secuencia génica de línea germinal de IGLV2, IGLV3 o IGKV1 humana. Se muestra una secuencia génica de línea germinal de V_L de IGLV2 humana, por ejemplo, números de Referencia Z73664, L27822, Y12412 e Y12413. Se muestra una secuencia génica de línea germinal de V_L de IGLV3 humana, por ejemplo, número de Referencia X57826.

Se muestra una secuencia génica de línea germinal de V_L de IGKV1 humana, por ejemplo, números de Referencia AF306358, AF490911, L12062, L12064, L12065, L12066, L12068, L12072, L12075, L12076, L12079, L12080, L12081, L12082, L12083, L12084, L12085, L12086, :12088, L12091, L12093, L12101, L12106, L12108, L12110, L12112, M95721, M95722, M95723, X73855, X73860, X98972, X98973, Z15073, Z15074, Z15075, Z15077, Z15079, Z15081. Como alternativa, los anticuerpos anti VIH incluyen una región V_L que está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 % homóloga de la secuencia génica de línea germinal de IGLV2, IGLV3 o IGKV1. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 % homóloga de la secuencia génica de línea germinal de IGLV2, IGLV3 o IGKV1 y, más preferentemente, al menos 98 %, 99 % homóloga de la secuencia génica de línea germinal de IGLV2, IGLV3 o IGKV1. La región V_L del anticuerpo anti CMV es al menos 80 % homóloga de la secuencia de aminoácidos de la región V_L codificada por la secuencia génica de línea germinal de IGLV2, IGLV3 o IGKV1. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la región V_L del anticuerpo anti VIH es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 % homóloga de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia génica de línea germinal de IGLV2, IGLV3 o IGKV1 y, más preferentemente, al menos 98 %, 99 % homóloga de la secuencia codificada por la secuencia génica de línea germinal de IGLV2, IGLV3 o IGKV1.

Tabla 7. Alineamiento de secuencias codificantes de cadena pesada del dominio variable de clones hermanos de 1443 C16 con 1443 C16 y 1496 C09. Las secuencias de CDR de Kabat para los clones hermanos de PG16 están destacadas en cajas.

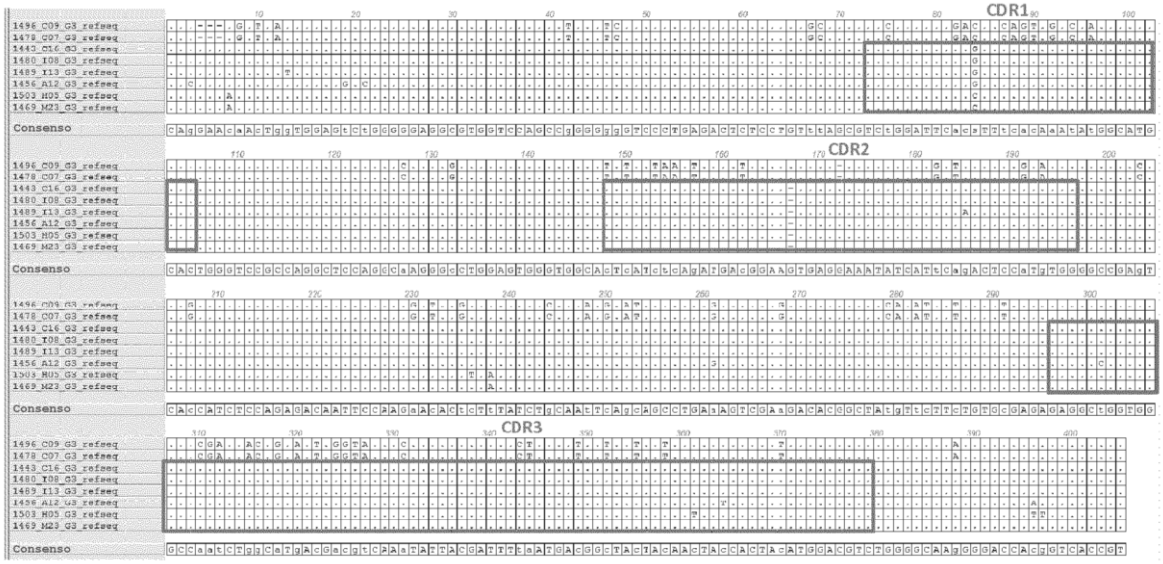


Tabla 8. Alineamiento de secuencias codificantes de cadena ligera del dominio variable de clones hermanos de 1443 C16 con 1443 C16 y 1496 C09. Las secuencias de CDR de Kabat para los clones hermanos de PG16 están destacadas en cajas.

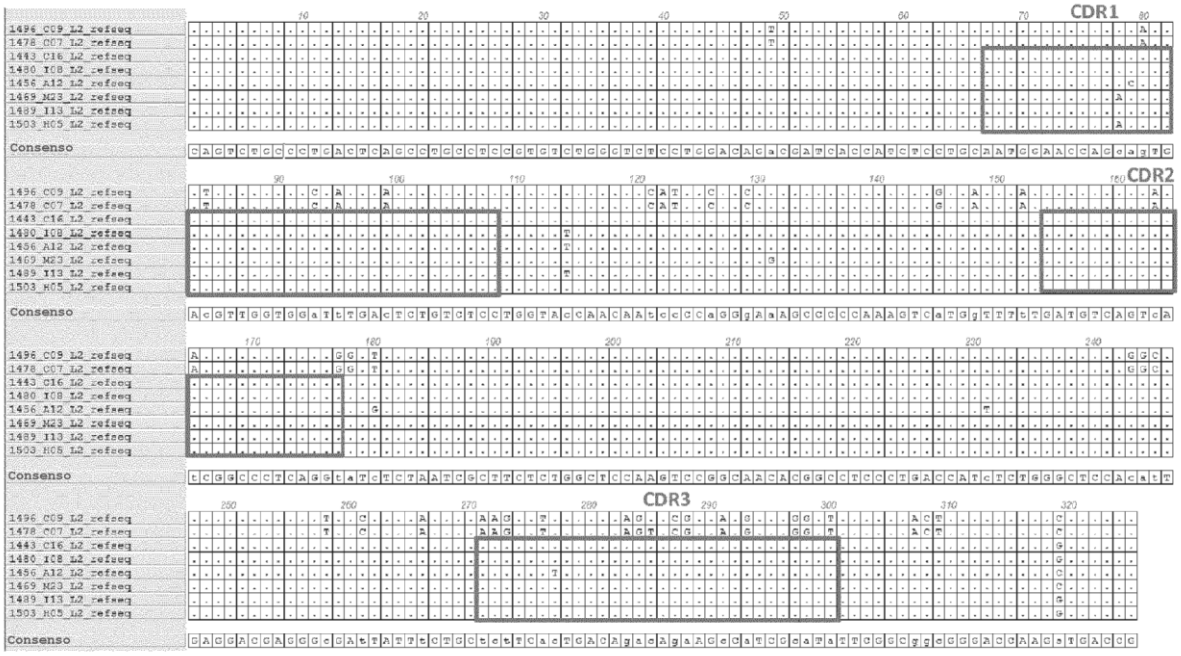


Tabla 9. Alineamiento de secuencias de proteínas de cadena pesada del dominio variable de clones hermanos de 1443 C16 con 1443 C16 y 1496 C09. Las secuencias de CDR de Kabat para los clones hermanos de PG16 están destacadas en cajas.

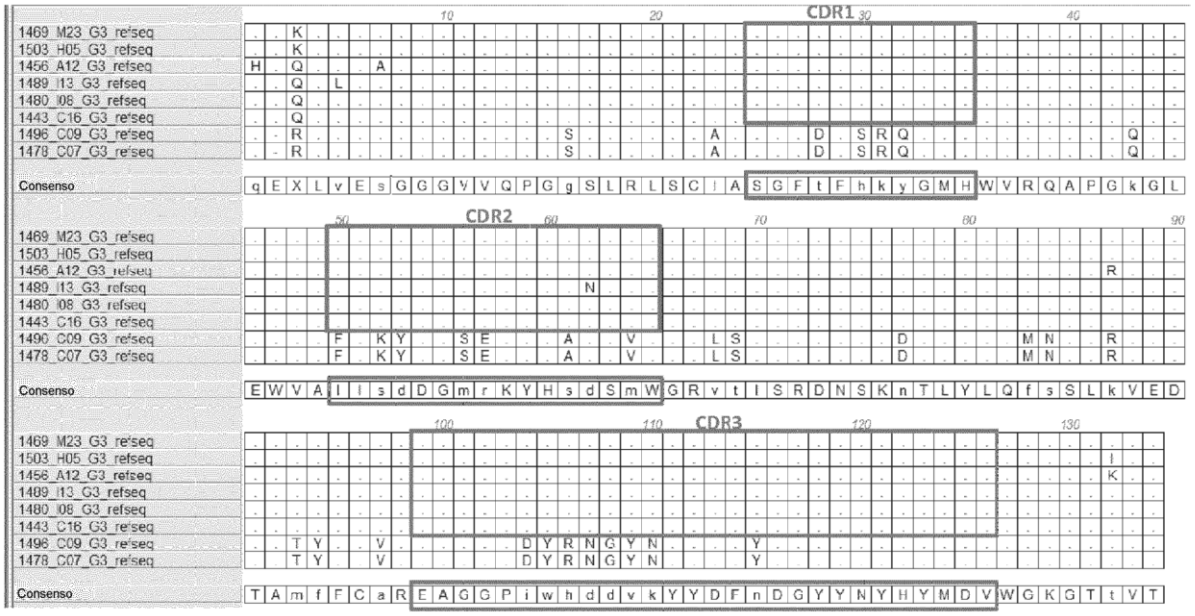


Tabla 10. Alineamiento de secuencias de proteínas de cadena ligera del dominio variable de clones hermanos de 1443 C16 con 1443 C16 y 1496 C09. Las secuencias de CDR de Kabat para los clones hermanos de PG16 están destacadas en cajas negras.

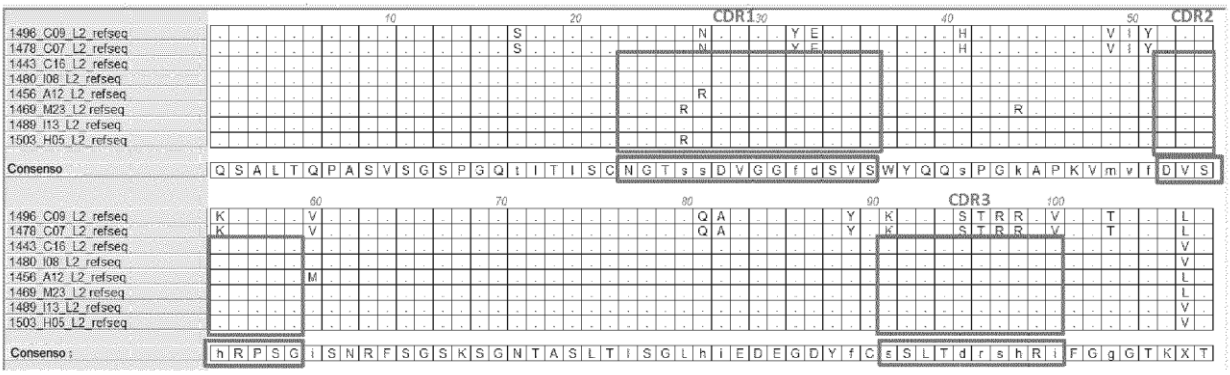

CDR1
CDR2
CDR3
1496_C09_L2_refseq
1478_C07_L2_refseq
1443_C16_L2_refseq
1480_I08_L2_refseq
1456_A12_L2_refseq
1469_M23_L2_refseq
1489_I13_L2_refseq
1503_H05_L2_refseq
Consenso
Consenso :

Tabla 11. Secuencias de nucleótidos consenso de CDR de Kabat de cadenas pesadas de clones hermanos de 1443 PG16.

CDR1:

1443 C16	TCTGGATTCAC**G**TTTCACAAATATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 68)
1469 M23	TCTGGATTCAC**C**TTTCACAAATATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 69)
1456 A12	TCTGGATTCAC**G**TTTCACAAATATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 68)
1503 H05	TCTGGATTCAC**C**TTTCACAAATATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 70)
1489 I13	TCTGGATTCAC**G**TTTCACAAATATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 68)
1480 I08	TCTGGATTCAC**G**TTTCACAAATATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 68)
Consenso*	TCTGGATTCAC**X**TTTCACAAATATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 71)
Variación	TCTGGATTCAC**G**TTTCACAAATATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 68)
Variación 2	TCTGGATTCAC**C**TTTCACAAATATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 70)

* En el que X es C o G, o en el que X es un aminoácido con propiedades físicas similares a C o G.

CDR2:

1443 C16	CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCA**G**ACTCCATGTGG (SEQ ID NO: 72)
1469 M23	CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCA**G**ACTCCATGTGG (SEQ ID NO: 72)
1456 A12	CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCA**G**ACTCCATGTGG (SEQ ID NO: 72)
1503 H05	CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCA**G**ACTCCATGTGG (SEQ ID NO: 72)
1489 I13	CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCA**A**ACTCCATGTGG (SEQ ID NO: 73)
1480 I08	CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCA**G**ACTCCATGTGG (SEQ ID NO: 72)
Consenso*	CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCA**X**ACTCCATGTGG (SEQ ID NO: 74)
Variación 1	CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCA**G**ACTCCATGTGG (SEQ ID NO: 72)
Variación 2	CTCATCTCAGATGACGGAATGAGGAAATATCATTCA**A**ACTCCATGTGG (SEQ ID NO: 73)

* En el que X es A o G, o en el que X es un aminoácido con propiedades físicas similares a A o G.

CDR3:

1443 C16 (SEQ ID NO:75)

GAGGC**T**GGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCTACTACAACTACCACTACATGGACGT
C

1469 M23 (SEQ ID NO: 75)

GAGGC**T**GGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCTACTACAACTACCACTACATGGACGT
C

1456 A12 (SEQ ID NO: 77)

(continuación)

GAGGC**C**GGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCTACTACAACTATCACTACATGGACGT
C

1503 H05 (SEQ ID NO:79)

GAGGC**T**GGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCTACTACAA**T**TACCACTACATGGACGT
C

1489 113 (SEQ ID NO: 75)

GAGGC**T**GGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCTACTACAACTACCACTACATGGACGT
C

1480 108 (SEQ ID NO: 75)

GAGGC**T**GGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCTACTACAACTACCACTACATGGACGT
C

Consenso (SEQ ID NO: 76)

GAGGC**X**GGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCTACTACAACTATCACTACATGGACGT
C

Variación 1 (SEQ ID NO: 78)

GAGGC**G**GGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCTACTACAACTATCACTACATGGACGT
C

Variación 2 (SEQ ID NO: 77)

GAGGC**C**GGTGGGCCAATCTGGCATGACGACGTCAAATATTACGATTTTAATGACGGCTACTACAACTATCACTACATGGACGT
C

* En el que X es T, C o G, o en el que X es un aminoácido con propiedades físicas similares a T, C o G.

Tabla 12. Secuencias de nucleótidos consenso de CDR de Kabat de cadenas ligeras de clones hermanos de 1443 PG16.

CDR1:

1443 C16	AATGGAACCAG**CA**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 80)
1469 M23	AATGGAACCAG**AA**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 82)
1456 A12	AATGGAACCAG**CC**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 83)
1503 H05	AATGGAACCAG**AA**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 82)
1489 I13	AATGGAACCAG**CA**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 80)
1480 I08	AATGGAACCAG**CA**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 80)
Consenso*	AATGGAACCAG**X_1X_2**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 81)
Variación 1	AATGGAACCAG**CA**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 80)
Variación 2	AATGGAACCAG**AA**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 82)
Variación 2	AATGGAACCAG**CC**GTGACGTTGGTGGATTTGACTCTGTCTCC (SEQ ID NO: 83)

* En el que X_1 es C o A, o en el que X_1 es un aminoácido con propiedades físicas similares a C o A. En el que X_2 es C o A, o en el que X_2 es un aminoácido con propiedades físicas similares a C o A.

CDR2:

1443 C16	GATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGT (SEQ ID NO: 84)
1469 M23	GATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGT (SEQ ID NO: 84)
1456 A12	GATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGT (SEQ ID NO: 84)
1503 H05	GATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGT (SEQ ID NO: 84)
1489 I13	GATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGT (SEQ ID NO: 84)
1480 I08	GATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGT (SEQ ID NO: 84)
Consenso	GATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGT (SEQ ID NO: 84)

CDR3:

1443 C16	TCTTCA**C**TGACAGACAGAAGCCATCGCATA (SEQ ID NO: 85)
1469 M23	TCTTCA**C**TGACAGACAGAAGCCATCGCATA (SEQ ID NO: 85)
1456 A12	TCTTCA**T**TGACAGACAGAAGCCATCGCATA (SEQ ID NO: 86)
1503 H05	TCTTCA**C**TGACAGACAGAAGCCATCGCATA (SEQ ID NO: 85)
1489 I13	TCTTCA**C**TGACAGACAGAAGCCATCGCATA (SEQ ID NO: 85)
1480 I08	TCTTCA**C**TGACAGACAGAAGCCATCGCATA (SEQ ID NO: 85)
Consenso*	TCTTCA**X**TGACAGACAGAAGCCATCGCATA (SEQ ID NO: 87)
Variación 1	TCTTCA**C**TGACAGACAGAAGCCATCGCATA (SEQ ID NO: 85)
Variación 2	TCTTCA**T**TGACAGACAGAAGCCATCGCATA (SEQ ID NO: 86)

* En el que X es C o T, o en el que X es un aminoácido con propiedades físicas similares a C o T.

Tabla 13: secuencias de proteínas consenso de CDR de Kabat de cadenas pesadas de clones hermanos de 1443 PG16.

CDR1:

1443 C16	SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
1469 M23	SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
1456 A12	SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
1503 H05	SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
1489 I13	SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
1480 I08	SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)
Consenso	SGFTFHKYGMH (SEQ ID NO: 88)

CDR2:

1443 C16	LISDDGMRKYHS**D**SMW (SEQ ID NO: 89)
1469 M23	LISDDGMRKYHS**D**SMW (SEQ ID NO: 89)
1456 A12	LISDDGMRKYHS**D**SMW (SEQ ID NO: 89)
1503 H05	LISDDGMRKYHS**D**SMW (SEQ ID NO: 89)
1489 I13	LISDDGMRKYHS**N**SMW (SEQ ID NO: 98)
1480 I08	LISDDGMRKYHS**D**SMW (SEQ ID NO: 89)
Consenso*	LISDDGMRKYH**S**XSMW (SEQ ID NO: 91)
Variación 1	LISDDGMRKYHS**D**SMW (SEQ ID NO: 89)
Variación 2	LISDDGMRKYHS**N**SMW (SEQ ID NO: 98)

* En el que X es D o N, o en el que X es un aminoácido con propiedades físicas similares a D o N

CDR3:

1443 C16	EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)
1469 M23	EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)
1456 A12	EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

(continuación)

1503 H05	EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)
1489 I13	EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)
1480 I08	EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)
Consenso	EAGGPIWHDDVKYYDFNDGYYNYHYMDV (SEQ ID NO: 6)

Tabla 14. Secuencias de proteínas consenso de CDR de Kabat de cadenas ligeras de clones hermanos de 1443 PG16.

CDR1:

1443 C16	NGT**SS**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
1469 M23	NGT**RS**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92)
1456 A12	NGT**SR**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 93)
1503 H05	NGT**RS**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92)
1489 I13	NGT**SS**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
1480 I08	NGT**SS**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
Consenso*	NGT**X_1X_2**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 94)
Variación 1	NGT**SS**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 97)
Variación 2	NGT**RS**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 92)
Variación 3	NGT**SR**DVGGFDSVS (SEQ ID NO: 93)

* En el que X_1 es S o R, o en el que X_1 es un aminoácido con propiedades físicas similares a S o R. En el que X_2 es S o R, o en el que X_2 es un aminoácido con propiedades físicas similares a S o R.

CDR2:

1443 C16	DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
1469 M23	DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
1456 A12	DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
1503 H05	DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
1489 I13	DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
1408 I08	DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)
Consenso	DVSHRPSG (SEQ ID NO: 95)

CDR3:

1443 C16	SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)
1469 M23	SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)
1456 A12	SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)
1503 H05	SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)
1489 I13	SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)
1408 I08	SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)
Consenso	SSLTDRSHRI (SEQ ID NO: 41)

Los anticuerpos monoclonales y recombinantes son particularmente útiles en la identificación y purificación de los polipéptidos individuales u otros antígenos contra los que se dirigen. Los anticuerpos de la memoria descriptiva y el anticuerpo de la invención tienen utilidad adicional porque pueden emplearse como reactivos en inmunoensayos, radioinmunoensayos (RIA) o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA). En estas aplicaciones, los anticuerpos pueden marcarse con un reactivo detectable de forma analítica tal como un radioisótopo, una molécula fluorescente o una enzima. Los anticuerpos también pueden usarse para la identificación y caracterización molecular (mapeo de epítopos) de antígenos.

Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos mencionados en general en la memoria descriptiva y el anticuerpo de la invención pueden usarse para mapear los epítopos con los que se unen. Los solicitantes han descubierto que el anticuerpo 1443_C16 (PG16) de la invención y los anticuerpos 1496_C09 (PG9), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) 1495_C14 (PGC14) 1469_M23 (PG16), 1456_A12 (PG16), 1503_H05 (PG16), 1489_I13 (PG16) y 1080_I08 (PG16) también mencionados en la memoria descriptiva neutralizan VIH. Aunque el solicitante no desea quedar ligado a la teoría, se postula que los anticuerpos 1496_C09 (PG9) 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) 1495_C14 (PGC14) 1469_M23 (PG16), 1456_A12 (PG16), 1503_H05 (PG16), 1489_I13 (PG16) y/o 1080_I08 (PG16) se unen con uno o más epítopos conformacionales formados por proteínas codificadas por VIH-1.

La actividad de neutralización de anticuerpos monoclonales humanos se ensayó frente a cepas del VIH-1 SF162 y JR-CSF. Las cepas de VIH-1 SF162 y JR-CSF pertenecen ambas al clado B del VIH. Cada anticuerpo monoclonal clonal se exploró con respecto a actividad de neutralización y con respecto a IgG anti gp120, anti gp41 y total en ELISA cuantitativo. Para los anticuerpos monoclonales 1456_P20, 1495_C14 y 1460_G14 se detectó unión específica anti antígeno gp120. Se detectó actividad de neutralización contra SF162, pero no JR-CSF para 1456_P20 (PG20), 1495_C14 (PGC14) y 1460_G14 (PGG14). Para las dos preparaciones de anticuerpos monoclonales que no mostraron unión con gp120 en el ensayo de ELISA, 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9), se

determinó que estaban presentes en el ensayo altas cantidades de IgG humano. Sin embargo, se descubrió que tanto 1443_C16 (PG16) como 1496_C09 (PG9), neutralizaban la actividad contra la cepa de VIH-1 JR-CSF, pero no contra la cepa SF162. También se descubrió que 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) carecían de actividad de unión a gp41 en el ensayo de ELISA.

Los epítopos reconocidos por estos anticuerpos pueden tener varios usos. Los epítopos y mimótopos en forma purificada o sintética pueden usarse para inducir respuestas inmunitarias (es decir como una vacuna, o para la producción de anticuerpos para otros usos) o para explorar suero de pacientes con respecto a anticuerpos que inmunorreaccionan con los epítopos o mimótopos. Preferentemente, dicho epítopo o mimótopo, o antígeno que comprende dicho epítopo o mimótopo se usa como una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria. El anticuerpo de la invención puede usarse en un método para supervisar la calidad de las vacunas en particular para comprobar que el antígeno en una vacuna contiene el epítopo inmunogénico correcto en la conformación correcta.

Los epítopos también pueden ser útiles en la exploración con respecto a ligandos que se unen con dichos epítopos. Dichos ligandos bloquean preferentemente los epítopos y por lo tanto previenen la infección. Dichos ligandos están abarcados dentro del alcance de la invención.

Pueden usarse técnicas convencionales de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican los anticuerpos o fragmentos de los anticuerpos de la presente invención. Pueden sintetizarse secuencias de ADN deseadas completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Pueden usarse técnicas de mutagénesis dirigida y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según sea apropiado.

Puede usarse cualquier sistema de célula hospedadora/vector adecuado para expresión de las secuencias de ADN que codifican las moléculas de anticuerpo de la presente invención o fragmentos de las mismas. Pueden usarse sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab y $F(ab')_2$, y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpo monocatenarios, por ejemplo, Fv monocatenarios. Pueden usarse sistemas de expresión de células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, de mamífero, para la producción de moléculas de anticuerpo mayores, incluyendo moléculas de anticuerpo completas. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células CHO, HEK293T, PER.C6, de mieloma o de hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.
La molécula de anticuerpo puede comprender solamente un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solamente es necesario usar una secuencia codificante de polipéptido de cadena pesada o cadena ligera para transfectar las células hospedadoras. Para la producción de productos que comprenden cadenas tanto pesadas como ligeras, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Como alternativa, puede usarse un único vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

Como alternativa, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede producirse (i) expresando una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula y ii) aislando el producto de anticuerpo expresado. Adicionalmente, el método puede incluir iii) purificar el anticuerpo. Se exploran linfocitos B transformadas con respecto a los que producen anticuerpos de la especificidad antigénica deseada y pueden después producirse clones de linfocitos B individuales a partir de las células positivas. La etapa de exploración puede llevarse a cabo mediante ELISA, mediante tinción de tejidos o células (incluyendo células transfectadas), un ensayo de neutralización o uno de varios otros métodos conocidos en la técnica para identificar especificidad de antígeno deseada. El ensayo puede seleccionarse basándose en reconocimiento de antígenos sencillo, o puede seleccionarse basándose adicionalmente en una función deseada por ejemplo para seleccionar anticuerpos neutralizantes en lugar de solamente anticuerpos de unión a antígeno, para seleccionar anticuerpos que pueden cambiar características de células diana, tales como sus cascadas de señalización, su forma, su velocidad de crecimiento, su capacidad de influencia en otras células, su respuesta a la influencia por otras células o por otros reactivos o por un cambio en las condiciones, su estado de diferenciación, etc.

La etapa de clonación para separar clones individuales de la mezcla de células positivas puede llevarse a cabo usando dilución limitante, micromanipulación, deposición de células individuales por clasificación celular u otro método conocido en la técnica. Preferentemente su clonación se lleva a cabo usando dilución limitante.

Los clones de linfocitos B inmortalizados de la invención pueden usarse de diversas maneras por ejemplo como una fuente de anticuerpos monoclonales, como una fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica un anticuerpo monoclonal de interés, para investigación, etc.

A no ser que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden habitualmente los expertos habituales en la materia. Además, a no ser que se

requiera de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular y química de proteínas y oligo o polinucleótidos e hibridación descritas en el presente documento son las que se conocen bien y se usan habitualmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realizan habitualmente en este campo o como se describe en el presente documento. La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica, muchas de las cuales se describen posteriormente con el fin de ilustrar. Dichas técnicas se explican completamente la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Maniatis *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I y II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames y S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames y S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).
Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son las bien conocidas y usadas habitualmente en este campo. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y suministro de productos farmacéuticos y tratamiento de pacientes.

Las siguientes definiciones son útiles en el entendimiento de la presente memoria descriptiva e invención:
el término “anticuerpo” (Ab) como se usa en el presente documento incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada. El término “inmunoglobulina” (Ig) se usa indistintamente con “anticuerpo” en el presente documento.

Un “anticuerpo neutralizante” puede inhibir la entrada del virus VIH-1 por ejemplo SF162 y/o JR-CSF con un índice de neutralización > 1,5 o > 2,0. (Kostrikis LG *et al*., J Virol. 1996; 70 (1): 445-458.) Por “anticuerpos neutralizantes amplios y potentes” se entienden anticuerpos que neutralizan más de una especie de virus VIH-1 (de diversos clados y diferentes cepas dentro de un clado) en un ensayo de neutralización. Un anticuerpo neutralizante amplio puede neutralizar al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más cepas diferentes de VIH-1, perteneciendo las cepas al mismo clado o a clados diferentes. Un anticuerpo neutralizante amplio puede neutralizar múltiples especies de VIH-1 que pertenecen a al menos 2, 3, 4, 5 o 6 clados diferentes. La concentración inhibidora del anticuerpo monoclonal puede ser menor de aproximadamente 25 mg/ml para neutralizar aproximadamente el 50 % del virus introducido en el ensayo de neutralización.

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéutico para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purifica: (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % en peso ; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratorio; o (3) hasta su homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, se prepara anticuerpo aislado por al menos una etapa de purificación.

La unidad de anticuerpo de cuatro cadenas básica es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades de 4-cadenas básicas junto con cadena J. En el caso de IgG, la unidad de 4-cadenas es en general de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L se une con una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene enlaces disulfuro intracatenarios separados regularmente Cada cadena H tiene en el dominio N terminal, una región variable (V_H) seguida de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal una región variable (V_L) seguida de un dominio constante (C_L) en su otro extremo.
La VL se alinea con la V_H y la C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de V_H y V_L entre sí forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton y Lange, Norwalk, Conn., 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie vertebrada puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados

kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácido de sus dominios constantes (C_L). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), pueden asignarse inmunoglobulinas a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas alfa (α), delta (δ), épsilon (ε), gamma (γ) y mu (Mμ), respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia C_H y su función, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios V difieren extensivamente en su secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente entre la extensión de 110 aminoácidos de las regiones variables. En su lugar, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones marco conservadas (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas "regiones hipervariables" que son cada una de 9-12 aminoácidos de longitud. Las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada una cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina-β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina-β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L, y alrededor de aproximadamente 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el VH cuando se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la V_L, y 26-32 (H1), 52-56 (H2) y 95-101 (H3) en el V_H cuando se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Chothia; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); y/o los restos de un "bucle hipervariable"/CDR (por ejemplo, restos 27-38 (L1), 56-65 (L2) y 105-120 (L3) en el V_L, y 27-38 (H1), 56-65 (H2) y 105-120 (H3) en el V_H cuando se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT; Lefranc, M.P. *et al.* Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999), Ruiz, M. *et al*. Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000)). Opcionalmente el anticuerpo tiene inserciones simétricas en uno o más de lo siguientes puntos 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) y 123 (L3) en la V_L, y 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) y 123 (H3) en la V_H cuando se numeran de acuerdo con AHo; Honneger, A. y Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001)).

Por "resto de ácido nucleico de línea germinal" se entiende el resto de ácido nucleico que aparece de forma natural en un gen de línea germinal que codifica una región constante o variable. El "gen de línea germinal" es el ADN hallado en una célula germinal (es decir, una célula destinada a convertirse en un óvulo o en el espermatozoide). Una "mutación en línea germinal" se refiere a un cambio heredable en un ADN particular que se ha producido en una célula germinal o el cigoto en el estadio de una única célula y, cuando se transmite a la descendencia, dicha mutación se incorpora en cada célula del cuerpo. Una mutación de línea germinal está en contraste con una mutación somática que se adquiere en una única célula corporal. En algunos casos, los nucleótidos en una secuencia de ADN de línea germinal que codifica una región variable se mutan (es decir, una mutación somática) y se reemplazan con un nucleótido diferente.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopo), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse por la metodología de hibridoma descrita en primer lugar por Kohler *et al*., Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas de animales o vegetales (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales " también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al*., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

En algunos aspectos, se usa el método de inmortalización de VEB alternativo descrito en el documento WO2004/076677. Usando este método, pueden transformarse linfocitos B que producen el anticuerpo de la invención con VEB en presencia de un activador de linfocitos B policlonal. La transformación con VEB es una técnica convencional y puede adaptarse fácilmente para incluir activadores en linfocitos B policlonales. Pueden añadirse estimulantes adicionales de crecimiento y diferenciación celular durante la etapa de transformación para potenciar adicionalmente la eficacia. Estos estimulantes pueden ser citocinas tales como IL-2 e IL-15. En un aspecto particularmente preferido, se añade IL-2 durante la etapa de inmortalización para mejorar adicionalmente la eficacia de inmortalización, pero su uso no es esencial.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a un homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas son idénticas a u homólogas de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véase Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; y Morrison *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). La presente invención proporciona secuencias de unión a antígeno de región variable derivadas de anticuerpos humanos. En consecuencia, los anticuerpos quiméricos de interés primario en el presente documento incluyen anticuerpos que tienen una o más secuencias de unión a antígeno humanas (por ejemplo, CDR) y que contienen una o más secuencias derivadas de un anticuerpo no humano, por ejemplo, una secuencia de región FR o C. Además, los anticuerpos quiméricos de interés primario en el presente documento incluyen los que comprenden una secuencia de unión a antígeno de región variable humana de una clase o subclase de anticuerpo y otra secuencia, por ejemplo, secuencia de región FR o C, derivada de otra clase o subclase de anticuerpo. Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento también incluyen los que contienen secuencias de unión a antígeno de región variable relacionadas con las descritas en el presente documento o derivadas de una especie diferente, tal como un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, Simio, etc.). Los anticuerpos quiméricos también incluyen anticuerpos primatizados y humanizados.

Además, los anticuerpos quiméricos pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la producción de anticuerpos. Para detalles adicionales, véase Jones *et al*., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al*., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Se considera en general que un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo humano que tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman típicamente de una región variable "importada". La humanización se realiza tradicionalmente siguiendo el método de Winter y Colaboradores (Jones *et al*., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al*., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al*., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo con secuencias de región hipervariable importadas las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano.
En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de una región variable humana intacta por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que contiene solamente secuencias presentes en un anticuerpo producido de forma natural por un ser humano. Sin embargo, como se usa en el presente documento, los anticuerpos humanos pueden comprender restos o modificaciones no hallados en un anticuerpo humano de origen natural, incluyendo las modificaciones y secuencias variantes descritas en el presente documento. Estas se realizan típicamente para refinar o potenciar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un C_L y al menos un dominio constante de cadena pesada C_H 1, C_H 2 y C_H 3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de secuencia de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase Patente de Estados Unidos N.º 5.641.870; Zapata *et al*., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La expresión "fragmento o análogo funcional" de un anticuerpo es un compuesto que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo anti-IgE es uno que puede unirse con una inmunoglobulina IgE de tal manera que evite o reduzca sustancialmente la capacidad de dicha molécula para tener la capacidad de unirse con el receptor de alta afinidad, $FC\varepsilon RI$.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento residual "Fc", una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento $F(ab')_2$ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por enlace disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y aún es capaz de reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab por tener pocos restos adicionales en el extremo carboxilo terminal del dominio C_H1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Se produjeron originalmente fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento "Fc" comprende las partes carboxilo terminal de ambas cadenas H unidas entre sí por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos se determinan mediante secuencias en la región Fc, cuya región también es la parte reconocida por receptores de Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente, estrecha. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (tres bucles de cada una de las cadena H y L) que aportan los restos de aminoácidos para la unión a antígeno y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso una única región variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con el antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

"Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido de sFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, mencionado posteriormente.

Los términos "diacuerpos" se refieren a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase párrafo precedente) con enlazadores cortos (de aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se consiga emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "de cruce" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Los anticuerpos de dominio (dAb), que pueden producirse en forma completamente humana, son los fragmentos de unión a antígeno más pequeños conocidos de anticuerpos, que varían de 11 kDa a 15 kDa. Los dAb son las regiones variables robustas de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas (VH y VL respectivamente). Están altamente expresados en cultivo de células microbianas, muestran propiedades biofísicas favorables incluyendo solubilidad y estabilidad de temperatura, y están bien adaptados para la selección y maduración de afinidad mediante sistemas de selección *in vitro* tal como presentación en fagos. Los dAb son bioactivos como monómeros y, debido a su pequeño tamaño y estabilidad inherente, puede dárseles formato como moléculas mayores para crear fármacos con semividas en suero prolongadas u otras actividades farmacológicas. Se han descrito ejemplos de esta tecnología en el documento WO9425591 para anticuerpos derivados de Ig de cadena pesada de *Camelidae*, así como en el documento US20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos completamente humanos de un único dominio de bibliotecas de fagos.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que se "internaliza" es uno que es captado por (es decir, entra en) la célula tras la unión con un antígeno de una célula de mamífero (por ejemplo, un polipéptido o receptor de superficie celular). El anticuerpo de internalización incluirá, por supuesto, fragmentos de anticuerpo, anticuerpo humano o quimérico, y conjugados de anticuerpos. Para ciertas aplicaciones terapéuticas, se contempla la internalización *in vivo*. El número de moléculas de anticuerpo internalizadas será suficiente o adecuado para destruir una célula o inhibir su crecimiento, especialmente una célula infectada. Dependiendo de la potencia del anticuerpo o conjugado de anticuerpo, en algunos casos, la captación de una única molécula de anticuerpo en la célula es suficiente para destruir la célula diana a la que se une el anticuerpo. Por ejemplo, ciertas toxinas son altamente potentes en destrucción de modo que la internalización de una molécula de la toxina conjugada con el anticuerpo es suficiente para destruir la célula infectada.

Como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo es "inmunoespecífico", "específico para" o "se

une específicamente con" un antígeno si reacciona a un nivel detectable con el antígeno, preferentemente con una constante de afinidad, K_a de más de o igual a aproximadamente 10^4 M^{-1}, o mayor o igual a aproximadamente 10^5 M^{-1}, más que o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1}, más de o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} o más de o igual a 10^8 M^{-1}. La afinidad de un anticuerpo por su antígeno afín también se expresa habitualmente como una constante de disociación K_D y, en ciertas realizaciones, el anticuerpo de VIH1 se une específicamente con un polipéptido de VIH1 si se une con una K_D de menos de o igual a 10^{-4} M, menos de o igual a aproximadamente 10^{-5} M, menos de o igual a aproximadamente 10^{-6} M, menos de o igual a 10^{-7} M o menos de o igual a 10^{-8} M. Las afinidades de anticuerpos pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas en Scatchard *et al*. (Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949)).

Pueden determinarse y evaluarse en general propiedades de unión de un anticuerpo con antígenos, células o tejidos de los mismos usando métodos de inmunodetección incluyendo, por ejemplo, ensayos basados en inmunofluorescencia, tales como inmunohistoquímica (IHC) y/o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo designado es uno que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distingue de otros anticuerpos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo con una característica biológica de un anticuerpo designado se unirá con el mismo epítopo que con el que se une el anticuerpo designado y/o tendrá una función efectora común con el anticuerpo designado.

El término anticuerpo "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye un anticuerpo que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un epítopo, polipéptido o una célula con la que se une específicamente. Los métodos para identificar anticuerpos antagonistas pueden comprender poner en contacto un polipéptido o una célula que se une específicamente con un anticuerpo antagonista candidato con el anticuerpo antagonista candidato y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido o la célula.

Un "anticuerpo que inhibe el crecimiento de células infectadas" o un anticuerpo "inhibidor del crecimiento" es uno que se une con y da como resultado inhibición medible del crecimiento de células infectadas que expresan o son capaces de expresar un epítopo de VIH1 con el que se une un anticuerpo. Los anticuerpos inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células infectadas en más del 20 %, preferentemente de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 % y, aún más preferentemente, en más del 50 % (por ejemplo, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %) en comparación con el control apropiado, siendo el control típicamente células infectadas no tratadas con el anticuerpo que se ensaya. La inhibición del crecimiento puede medirse a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 µg/ml o de aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, en el que la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de exposición de las células infectadas al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de células infectadas *in vivo* puede determinarse de diversas maneras conocidas en la técnica.

El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo a aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da como resultado la reducción de porcentaje de células infectadas o el número total de células infectadas en un periodo de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en un periodo de aproximadamente 5 a 30 días.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce muerte celular programada como se determina por unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos). Preferentemente, la célula es una célula infectada. Están disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidilserina (PS) puede medirse mediante unión de anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante escalera de ADN; y la condensación de cromatina/nuclear junto con la fragmentación de ADN pueden evaluarse por cualquier aumento en células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que da como resultado una inducción de aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente de aproximadamente 5 a 50 veces y más preferentemente de aproximadamente 10 a 50 veces, de unión a anexina en relación con una célula no tratada en un ensayo de unión a anexina.

Las "funciones efectoras" de anticuerpos se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan

específicamente con una célula diana portadora de antígenos y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son necesarios para dicha destrucción. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 4 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 5.500.362 o la patente de Estados Unidos. N.º 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK).

Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656 (1998).

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FCγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácido similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (véase revisión M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel *et al*., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas *et al*., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al*., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim *et al*., J. Immunol. 24:249 (1994)).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen PBMC, linfocitos NK, monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose PBMC y linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) con anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen con su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al*., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Un "mamífero" para fines de tratamiento de una infección, se refiere a cualquier mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales zoológicos, deportivos o mascotas, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas; en los que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección patológica o el trastorno diana. Los que necesiten tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno, así como los propensos a tener el trastorno o en los que deba prevenirse el trastorno. Un sujeto o mamífero se "trata" con éxito para una infección si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo de acuerdo con los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible en o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción del número de células infectadas o ausencia de las células infectadas; reducción del porcentaje de células totales que están infectadas; y/o alivio en algún grado, de uno o más de los síntomas asociados con la infección específica; reducción de la morbilidad y mortalidad, y mejora en asuntos de calidad de vida. Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento exitoso y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos rutinarios con los que está familiarizado un médico.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo o un fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno de un sujeto o mamífero. Véase la definición precedente de "tratar".

La administración "crónica" se refiere a la administración del agente o los agentes de un modo continuo a diferencia de un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial (la actividad) durante un periodo de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción sino que es de naturaleza cíclica.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultanea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Los “vehículos" como se usa en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone al mismo a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG) TWEEN™, y PLURONICS™.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente. Se describen posteriormente otros agentes citotóxicos.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, bien *in vitro* o bien *in vivo*. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular, tales como agentes que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen los alcaloides de la vinca (vincristina, vinorelbina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se propagan a detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al*. (W B Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos, derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAX-OL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos previniendo la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

"Marcador" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto detectable o composición que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable en sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una composición sustrato que es detectable.

La expresión "marcado por epítopo" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido fusionado con un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene suficientes restos para proporcionar un epítopo contra el que puede prepararse un anticuerpo, pero es suficientemente corto para que no interfiera con la actividad de polipéptido con el que se fusiona. El polipéptido marcador también es preferentemente bastante único, de modo que el anticuerpo no reaccione de forma cruzada sustancialmente con otros epítopos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos seis restos de aminoácidos y habitualmente entre 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

En el presente documento se define que una "molécula pequeña" tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a ARN mono o bicatenario, ADN o polímeros mixtos. Los polinucleótidos pueden incluir secuencias genómicas, extragenómicas y secuencias plasmídicas, y segmentos génicos modificados técnicamente más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar polipéptidos.

Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que está separado sustancialmente de otras secuencias de ADN genómicas, así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan de forma natural a una secuencia nativa. La expresión abarca una secuencia de ácido nucleico que se ha eliminado de su ambiente de origen natural e incluye aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Un ácido nucleico sustancialmente puro incluye

formas aisladas del ácido nucleico. Por supuesto, esto se refiere al ácido nucleico como se aisló originalmente y no excluye genes o secuencias añadidas posteriormente al ácido nucleico aislado por la mano del hombre.

El término "polipéptido" se usa en su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica del producto. Se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas dentro de la definición de polipéptido, y dichos términos pueden usarse indistintamente en el presente documento a no ser que se indique específicamente de otro modo. Este término tampoco se refiere a o excluye modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. Un polipéptido puede ser una proteína completa, o una subsecuencia de la misma. Los polipéptidos particulares de interés en el contexto de la presente invención son subsecuencias de aminoácidos que comprenden CDR y son capaces de unirse con un antígeno o una célula infectada por VIH.

Un "polipéptido aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. En realizaciones preferidas, el polipéptido aislado se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de polipéptido como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta su homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un polinucleótido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de nucleótidos que un polinucleótido derivado de la naturaleza. Un polipéptido "de secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) derivado de la naturaleza (por ejemplo, de cualquier especie). Dichos polinucleótidos y polipéptidos de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos.

Una "variante" polinucleotídica, como se usa el término en el presente documento, es un polinucleótido que difiere típicamente de un polinucleótido desvelado específicamente en el presente documento en una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse de forma sintética, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polinucleotídicas de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido codificado como se describe en el presente documento y/o usando cualquiera de varias de técnicas bien conocidas en este campo.

Una "variante" polipeptídica, como se usa el término en el presente documento, es un polipéptido que difiere típicamente de un polipéptido desvelado específicamente en el presente documento en una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse de forma sintética, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido como se describe en el presente documento y/o usando cualquiera de varias técnicas bien conocidas en este campo.

Pueden realizarse modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y obtener aún una molécula funcional que codifica un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante equivalente, o incluso una mejorada, o parte de un polipéptido de la invención, un experto en la materia cambiará típicamente uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de su capacidad por unirse con otros polipéptidos (por ejemplo, antígenos) o células. Ya que es la capacidad de unión y naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos pueden realizarse en una secuencia proteica y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente, y no obstante obtener una proteína con propiedades similares. Se contempla por lo tanto que pueden realizarse diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones desveladas, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

En muchos casos, una variante polipeptídica contendrá una o más sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una en la que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la materia de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no cambie sustancialmente.

Al realizar dichos cambios, puede tenerse en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva en una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido

contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y características de carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se conoce en la técnica que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y aún dar como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, obtener aún una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al realizar dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ±2, se prefieren particularmente los que están dentro de ±1 y se prefieren aún más particularmente los que están dentro de ±0,5. También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente basándose en la hidrofilia. La Patente de Estados Unidos 4.554.101 indica que la hidrofilia promedio local mayor de una proteína, dominada por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la Patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a los restos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0±1); glutamato (+3,0±1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5±1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y obtener aún una proteína biológicamente equivalente y, en particular, una inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia estén dentro de ±2, se prefieren particularmente los que estén dentro de ±1 y se prefieren aún más particularmente los que estén dentro de ±0,5.

Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan en general por lo tanto en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Los expertos en la materia conocen bien sustituciones ejemplares que toman varias de las características anteriores en consideración e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Pueden realizarse adicionalmente sustituciones de aminoácidos basándose en la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante puede contener también, o como alternativa, cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, supresión o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes pueden modificarse también (o como alternativa) mediante, por ejemplo, la supresión o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima en la inmunogenicidad, estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido.

Los polipéptidos pueden comprender una secuencia de señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige de forma co-traduccional o post-traduccional la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede conjugarse con un enlazador u otra secuencia para facilidad de síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para potenciar la unión de polipéptido con un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una región Fc de inmunoglobulina.

Al comparar secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es igual cuando se alinean para máxima correspondencia, como se describe posteriormente. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinearse óptimamente las dos secuencias.

Puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación usando el programa Megalign en el conjunto Lasergene de software bioinformático (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa abarca varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenes pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183,

Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726-730.

Como alternativa, puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación mediante al algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482, mediante el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante los métodos de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 y Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. Pueden usarse BLAST y BLAST 2.0, por ejemplo con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. El software para realizar análisis de BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

En un ejemplo ilustrativo, pueden calcularse las puntuaciones acumuladas usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos desapareados; siempre <0). La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada desciende una cantidad X desde su valor máximo obtenido; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de una de las secuencias. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11 y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alineamientos, (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras.

Para secuencias de aminoácidos, puede usarse una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada desciende en la cantidad X desde su valor máximo obtenido; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento.

En un enfoque, el "porcentaje de identidad de secuencias" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la parte de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, habitualmente 5 a 15 por ciento o 10 a 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o supresiones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en el que las bases de ácido nucleico o los restos de aminoácidos idénticos aparecen en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

La “homología” se refiere al porcentaje de restos en la variante de secuencia polinucleotídica o polipeptídica que son idénticos a secuencia no variante después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje de homología máximo. En realizaciones particulares, las variantes polinucleotídicas y polipeptídicas tienen al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de homología de polinucleótido o polipéptido con un polinucleótido o polipéptido descrito en el presente documento.

"Vector" incluye vectores lanzadera y de expresión. Típicamente, la construcción plasmídica también incluirá un origen de replicación, (por ejemplo, el origen de replicación de ColE1) y un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a ampicilina o tetraciclina), para replicaciones y selección, respectivamente, de los plásmidos en bacterias. Un "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene las secuencias de control o elementos reguladores necesarios para expresión de los anticuerpos incluyendo fragmento de anticuerpo de la invención, en células bacterianas o eucariotas. Se desvelan posteriormente vectores adecuados. Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un” y “el” incluyen referencias plurales a no ser que el contenido dicte claramente otra cosa.

La invención también incluye secuencias de ácido nucleico que codifican parte de o todas las cadenas ligeras y pesadas y CDR de la presente invención. Debido a la redundancia del código genético, existirán variantes de estas

secuencias que codifiquen las mismas secuencias de aminoácidos.

También se enumeran en la solicitud anticuerpos variantes. Pueden obtenerse variantes adicionales de las secuencias de anticuerpo que tienen afinidad mejorada usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para obtener anticuerpos con afinidad mejorada adicionalmente. Como alternativa, puede usarse optimización de codones de la secuencia de nucleótidos para mejorar la eficacia de traducción en sistemas de expresión para la producción del anticuerpo.

Por ejemplo, dichas secuencias de anticuerpos variantes compartirán 70 % o más (es decir 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 % o más) de identidad de secuencia con las secuencias enumeradas en la solicitud. Preferentemente, dicha identidad de secuencias se calcula con respecto a la longitud completa de la secuencia de referencia (es decir la secuencia enumerada en la solicitud). Preferentemente, el porcentaje de identidad, como se indica en el presente documento, es como se determina usando BLAST versión 2.1.3 usando los parámetros por defecto especificados por el NCBI (el Centro Nacional para la Información Biotecnológica; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) [matriz Blosum 62; penalización de apertura de hueco=11 y penalización de extensión de hueco=1].

Se describen además vectores tales como vectores de expresión, que comprenden una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. También se incluyen células transformadas con dichos vectores dentro del alcance de la invención.

Como entenderán los expertos en la materia, la descripción general de anticuerpos en el presente documento y métodos para prepararlos y usarlos también se aplican a constituyentes polipeptídicos de anticuerpos individuales y fragmentos de anticuerpo.

Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Sin embargo, la presente invención se refiere específicamente al anticuerpo anti-VIH PG16 que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales y se describen en general, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 6.824.780.

Típicamente, se producen anticuerpos de forma recombinante, usando vectores y métodos disponibles en la técnica, como se describe adicionalmente posteriormente. También pueden generarse anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* (véase Patente de Estados Unidos N.º 5.567.610 y 5.229.275).

También pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de producción de anticuerpos endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes en línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); patentes de Estados Unidos N.º 5.545.806. 5.569.825. 5.591.669 (todas de GenPharm); Patente de Estados Unidos N.º 5.545.807; y documento WO 97/17852. Dichos animales pueden modificarse genéticamente para producir anticuerpos humanos que comprenden un polipéptido de la presente invención.

En general, los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos que comprenden secuencias derivadas de fuentes tanto humanas como no humanas. Por ejemplo, estos anticuerpos quiméricos están humanizados o primatized™. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos quiméricos también incluyen anticuerpos humanos en los que la región hipervariable humana o una o más CDR se conservan, pero una o más regiones adicionales de secuencia se han reemplazado por secuencias correspondientes de un animal no humano.

La elección de secuencias no humanas, tanto ligeras como pesadas, para usar en la preparación de los anticuerpos quiméricos es importante para reducir la antigenicidad y las respuestas de anticuerpo humano anti-no-humano cuando se pretende que el anticuerpo sea para uso terapéutico humano. Es importante además, que los anticuerpos quiméricos conserven alta afinidad de unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos quiméricos por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos quiméricos conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias humanas y no humanas parentales. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas.

La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse a partir de la secuencia receptora e importada de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de región hipervariable que están implicados directamente y más sustancialmente en la influencia en la unión a antígeno.

Como se ha observado anteriormente, los anticuerpos (o inmunoglobulinas) pueden dividirse en cinco clases diferentes, basándose en las diferencias en las secuencias de aminoácidos en la región constante de las cadenas pesadas. Todas las inmunoglobulinas dentro de una clase dada tienen regiones constantes de cadena pesada muy similares. Estas diferencias pueden detectarse por estudios de secuencias o más habitualmente por medios serológicos (es decir mediante el uso de anticuerpos dirigidos a estas diferencias). En general, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden ser de cualquier clase y pueden, por lo tanto, tener una cadena pesada gamma, mu, alfa, delta o épsilon. Una cadena gamma puede ser gamma 1, gamma 2, gamma 3 o gamma 4; y una cadena alfa puede ser alfa 1 o alfa 2.

Por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento del mismo puede ser un IgG. IgG se considera la inmunoglobulina más versátil, debido a que es capaz de llevar a cabo todas las funciones de moléculas de inmunoglobulina. IgG es la Ig principal en el suero, y la única clase de Ig que cruza la placenta. IgG también fija complemento, aunque la subclase IgG4 no. Los macrófagos, monocitos, PMN y algunos linfocitos tienen receptores de Fc para la región Fc de IgG. No todas las subclases se unen igualmente bien; IgG2 e IgG4 no se unen con receptores de Fc. Una consecuencia de la unión con los receptores de Fc en PMN, monocitos y macrófagos es que la célula puede ahora internalizar el antígeno mejor. IgG es una opsonina que potencia la fagocitosis. La unión de IgG con receptores de Fc en otros tipos de células da como resultado la activación de otras funciones. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser de cualquier subclase de IgG.

Además, un anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un IgE. IgE es la Ig de suero menos común ya que se une muy estrechamente con receptores de Fc en basófilos y mastocitos incluso antes de interaccionar con el antígeno. Como consecuencia de su unión con basófilos y mastocitos, IgE está implicado en reacciones alérgicas. La unión del alérgeno con el IgE en las células da como resultado la liberación de diversos mediadores farmacológicos que dan como resultado síntomas alérgicos. IgE también desempeña un papel en enfermedades parasitarias de helmintos. Los eosinófilos tienen receptores de Fc para IgE y la unión de eosinófilos con helmintos recubiertos con IgE da como resultado la destrucción del parásito. IgE no fija el complemento.

En general, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden comprender una cadena ligera variable que es kappa o lambda. La cadena lamba puede ser de cualquier subtipo, incluyendo, por ejemplo, lambda 1, lambda 2, lambda 3 y lambda 4.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona además fragmentos de anticuerpo que comprenden un polipéptido de la presente invención. En ciertas circunstancias existen ventajas para el uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. Por ejemplo, el menor tamaño de los fragmentos permite una rápida eliminación, y puede conducir a acceso mejorado a ciertos tejidos, tales como tumores sólidos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen: fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al*., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al*., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la fácil producción de cantidades grandes de estos fragmentos. Los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al*., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ con semivida *in vivo* aumentada que comprende un receptor de recuperación que se une con restos de epítopos se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el practicante experto en la materia.

En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patentes de Estados Unidos N.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes. Por lo tanto, son adecuados para unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión sFv para producir fusión de una proteína efectora en el extremo amino o el carboxilo terminal de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo puede también ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de

anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse con dos epítopos diferentes de un único antígeno. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un primer sitio de unión a antígeno con un sitio de unión para un segundo antígeno. Como alternativa, una rama anti-VIH1 puede combinarse con una rama que se une con una molécula desencadenante en una rama que se une con una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para centrar y localizar mecanismos de defensa celular en la célula infectada. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células infectadas. Estos anticuerpos poseen una rama de unión a VIH1 y una rama que se une con el agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o isótopo radiactivo hapteno). Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$). El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la Patente de Estados Unidos N.º 5.837.234 desvela un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. Se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα en el documento WO98/02463. La Patente de Estados Unidos N.º 5.821.337 enseña un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al*., Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla de potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al*., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan regiones variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C_H1), que contiene el sitio necesario para unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en una célula hospedadora adecuada. Esto proporciona mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptico del anticuerpo biespecífico deseado. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no tienen un efecto significativo en el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente la mitad de la mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al*., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse técnicamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o “heteroconjugados”. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP

03089). Pueden realizarse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en la técnica agentes de reticulación adecuados, y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al*., Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejo con ditiol, arsenita sódica, para estabilizar ditioles adyacentes y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después al Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al*., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico humanizado $F(ab')_2$. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse con células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al*., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita en Hollinger *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios V_H y V_L de un fragmento a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha indicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al*., J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al*., J. Immunol. 147: 60 (1991). Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno con el que se unan los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente memoria descriptiva pueden ser anticuerpos multivalentes con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminales de la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en la que la cadena o las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más regiones variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, en las que VD1 es una primera región variable, VD2 es una segunda región variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento comprende además preferentemente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de región variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de región variable de cadena ligera. Los polipéptidos de región variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden una región variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un domino C_L.

Los anticuerpos de la memoria descriptiva incluyen además anticuerpos monocatenarios. En realizaciones particulares, los anticuerpos de la memoria descriptiva pueden ser anticuerpos de internalización.

Se contemplan en el presente documento modificación o modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo cambios de

nucleótidos apropiados en un polinucleótido que codifica el anticuerpo, o una cadena del mismo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar al anticuerpo final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos post-traduccionales del anticuerpo, tal como cambiar el número o la posición de sitios de glucosilación. Puede incluirse cualquiera de las variaciones y modificaciones descritas anteriormente para polipéptidos en anticuerpos de la presente memoria descriptiva.

Un método útil para identificación de ciertos restos o regiones de un anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina “mutagénesis de exploración de alanina” como se describe en Cunningham y Wells en Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un resto o un grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o con carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno PSCA. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón diana o la región y las variantes de anti-anticuerpo expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en su longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variaciones de inserción de un anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazada por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se contemplan sustituciones conservativas y no conservativas.

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. Por el contrario, puede añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental. En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generan. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto de gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y un antígeno o una célula infectada. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en el presente documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende suprimir uno o más restos de carbohidrato hallados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácidos excepto prolina, son las secuencias de

reconocimiento para unión enzimática del resto del carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

En general, los anticuerpos como se desvela en el presente documento pueden modificarse con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción de células mediada por complemento aumentada y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al*., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-infección potenciada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al*., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede modificarse técnicamente un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y pueden por lo tanto tener capacidades de lisis del complemento potenciada y ADCC. Véase Stevenson *et al*., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítopo de unión a receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión “epítopo de unión a receptor de recuperación” se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4) que es responsable del aumento de la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

Además, los anticuerpos como se desvela en el presente documento también pueden modificarse para incluir un marcador o una etiqueta epitópicos, por ejemplo, para su uso en aplicaciones de purificación o diagnóstico. La memoria descriptiva también se refiere la terapia con inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente antineoplásico tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento. Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados.

También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una calicheamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Además, un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) como se desvela en el presente documento puede conjugarse con una o más moléculas maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto africano oriental *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos N.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de Estados Unidos N.º 4.151.042). Se desvelan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

En un intento de mejorar su índice terapéutico, se han conjugado maitansina y maitansinoides con anticuerpos que se unen específicamente con antígenos de células tumorales. Se desvelan inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.208.020, 5.416.064 y Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describió inmunoconjugados que comprendían un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para células cancerosas de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo.*

Se preparan conjugados de anticuerpo-maitansinoide ligando químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas maitansinoides conjugadas por moléculas de anticuerpo ha mostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar de forma negativa a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se desvelan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente a las que se ha hecho referencia anteriormente en el presente documento. Son maitansinoides preferidos maitansinol y análogos de

maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la Patente de Estados Unidos Nº. 5.208.020 o Patente EP 0 425 235 B1 y Chari *et al*., Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles por ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles por peptidasa o grupos lábiles por esterasa, como se ha desvelado en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter.

Pueden prepararse inmunoconjugados usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al*., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro. Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al*., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético marcado en el carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácidos, Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de Estados Unidos Nº. 5.208.020).

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de calicheamicina de antibióticos es capaz de producir roturas de ADN bicatenarias a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de calicheamicina, véase las Patentes de Estados Unidos N.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Otro fármaco con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto calicheamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruza fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Los ejemplos de otros agentes que pueden conjugarse con los anticuerpos como se desvela en el presente documento incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de Estados Unidos N.º 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen, por ejemplo, cadena A de la difteria, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteína de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232.

La presente memoria descriptiva muestra además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para destrucción selectiva de células infectadas, el anticuerpo incluye un átomo altamente radiactivo. Está disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos anti-PSCA radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Rc^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo tc^{99m} o I^{123}, o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, irm), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

El radiomarcador u otro marcador se incorporan en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcadores tales como tc^{99m} o I^{123} Re^{186}, Re^{188} e In^{111} mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio-90 mediante un resto de lisina. El método de IODOGEN (Fraker *et al*. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Como alternativa, se prepara una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas mediante una región que codifique un péptido enlazador que no destruya las propiedades deseadas del conjugado.

Los anticuerpos como se desvela en el presente documento también pueden usarse en terapia de profármaco mediada por enzima dependiente de anticuerpo (ADET) conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase documento WO 81/01145) en un fármaco antineoplásico (véase, por ejemplo, documento WO 88/07378 y Patente de Estados Unidos N.º 4.975.278).

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma citotóxica, más activa. Las enzimas que son útiles en este método incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanil carboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos tales como β-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como “abzimas”, pueden usarse para convertir los profármacos en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-abzima como se describe en el presente documento para suministro de la abzima a una población de células infectadas.

Las enzimas como se desvela en el presente documento pueden unirse covalentemente con los anticuerpos por técnicas bien conocidas en este campo tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales analizados anteriormente. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo unida a al menos una parte funcionalmente activa de una enzima usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Neuberger *et al*., Nature, 312: 604-608 (1984)).

Se contemplan en el presente documento otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse con uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington’s Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden formularse como inmunoliposomas. Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para el suministro de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición lipídica de membranas biológicas. Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al*., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Patentes de Estados Unidos N.º 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Se desvelan liposomas con tiempo de circulación potenciado en la Patente de Estados Unidos N.º 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen liposomas mediante filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro a deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab’ del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin *et al*., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon *et al*., J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

En general, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden poseer cualquiera de una diversidad de características biológicas o funcionales. La memoria descriptiva, sin embargo, muestra anticuerpos que son anticuerpos específicos de proteína de VIH1, lo que indica que se unen específicamente con o se unen preferentemente con VIH1 en comparación con una célula de control normal. Más específicamente, sin embargo, el anticuerpo de la presente invención es anticuerpo anti-VIH, en el que dicho anticuerpo es PG16 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

En realizaciones particulares, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo antagonista, que bloquea o inhibe parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido o una célula con el que se une de forma específica o preferente. En otras realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo inhibidor del crecimiento, que bloquea o inhibe parcial o completamente el crecimiento de una célula infectada con la que se une. En otra realización, el anticuerpo de la presente invención induce apoptosis. En otra realización más, el anticuerpo de la presente invención induce o promueve citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo o citotoxicidad dependiente del complemento.

Se usan células que expresan VIH1 o virus descrito anteriormente para explorar la muestra biológica obtenida de un paciente infectado con VIH1 con respecto a la presencia de anticuerpos que se unen preferentemente con la célula que expresa polipéptidos de VIH1 usando técnicas biológicas convencionales. Por ejemplo, los anticuerpos pueden estar marcados, y la presencia de marcador estar asociada con la célula detectada, por ejemplo, usando análisis de FMAT o FAC. En realizaciones particulares, la muestra biológica es sangre, suero, plasma, lavado bronquial o saliva. Pueden practicarse métodos de la presente invención usando técnicas de alto rendimiento.

Pueden caracterizarse después adicionalmente anticuerpos humanos identificados. Por ejemplo, los epítopos conformacionales particulares con los polipéptidos de VIH1 que son necesarios o suficientes para la unión del anticuerpo pueden determinarse, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida de polipéptidos de VIH1 expresados. Estos métodos pueden adaptarse fácilmente para identificar anticuerpos humanos que se unen con cualquier proteína expresada en una superficie celular. Además, estos métodos pueden adaptarse para determinar la unión del anticuerpo con el virus en sí mismo, a diferencia de una célula que expresa VIH1 recombinante o infectada con el virus.

Pueden subclonarse secuencias polinucleotídicas que codifican los anticuerpos, regiones variables de los mismos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en vectores de expresión para la producción recombinante de anticuerpos anti-VIH1 humanos. Por ejemplo, esto puede conseguirse obteniendo células mononucleares del paciente del que se obtuvo el suero que contenía el anticuerpo de VIH1 identificado; produciendo clones de linfocitos B de las células mononucleares; induciendo que los linfocitos B se conviertan en células plasmáticas productoras de anticuerpo; y explorando los sobrenadantes producidos por las células plasmáticas para determinar si contienen el anticuerpo de VIH1. Una vez que se ha identificado un clon de linfocitos B que produce un anticuerpo de VIH1, se realiza reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) para clonar los ADN que codifican las regiones variables o partes de las mismas del anticuerpo de VIH1. Estas secuencias se subclonan después en vectores de expresión adecuados para la producción recombinante de anticuerpos de VIH1 humanos. La especificidad de unión puede confirmarse determinando la capacidad del anticuerpo recombinante para unirse con células que expresan polipéptido de VIH1.

En ejemplos particulares de los métodos descritos en el presente documento, se clasifican linfocitos B aislados de ganglios linfáticos o sangre periférica, por ejemplo, basándose en que sean CD19 positivas, y se siembran, por ejemplo, con tan poco como una especificidad de una única célula por pocillo, por ejemplo, en configuraciones de 96, 384 o 1536 pocillos. Se induce que las células se diferencien en células productoras de anticuerpos, por ejemplo, células plasmáticas, y los sobrenadantes de cultivo se recogen y se ensayan con respecto a unión con células que expresan el polipéptido de agente infeccioso en su superficie usando, por ejemplo, análisis de FMAT o FACS. Los pocillos positivos se someten después a RT-PCR completa para amplificar regiones variables de cadena pesada y ligera de la molécula de IgG expresada por las células plasmáticas descendientes clonales. Los productos de PCR resultantes que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera, o partes de las mismas, se subclonan en vectores de expresión de anticuerpos humanos para expresión recombinante. Los anticuerpos recombinantes resultantes se ensayan después para confirmar su especificidad de unión original y pueden ensayarse adicionalmente con respecto a pan-especificidad entre diversas cepas de aislados del agente infeccioso.

Por lo tanto, un método de identificación de anticuerpos de VIH1 puede practicarse de la siguiente manera. En primer lugar, se transfectan ADNc de VIH1 de longitud completa o aproximadamente de longitud completa a una línea celular para expresión de polipéptidos de VIH1. En segundo lugar, se ensayan muestras de plasma o suero humanas individuales con respecto a anticuerpos que se unan con los polipéptidos de VIH1 expresados en células. Y en último lugar, se caracterizan mAb derivados de individuos plasma o suero positivos con respecto a unión a los mismos polipéptidos de VIH1 expresados en células. Puede realizarse definición adicional de las especificidades finas de los mAb en este momento.

Pueden asilarse polinucleótidos que codifican los anticuerpos de VIH1 como se desvelan en el presente documento o partes de los mismos a partir de células que expresan anticuerpos de VIH1, de acuerdo con métodos disponibles en la técnica y descritos en el presente documento, incluyendo amplificación por reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos para regiones conservadas de polipéptidos de anticuerpos humanos. Por ejemplo, pueden clonarse regiones variables de cadena ligera y cadena pesada a partir del linfocito B de acuerdo con técnicas de biología molecular descritas en el documento WO 92/02551; Patente de Estados Unidos 5.627.052; o Babcook *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-48 (1996). En ciertas realizaciones, se subclonan y secuencian polinucleótidos que codifican todas o una región de las regiones variables de cadena tanto pesada como

ligera de la molécula de IgG expresada por las células plasmáticas descendientes clonales que expresan el anticuerpo de VIH1. La secuencia del polipéptido codificado puede determinarse fácilmente a partir de la secuencia polinucleotídica.

Pueden subclonarse polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido desvelado en el presente documento en un vector de expresión para producir de forma recombinante los anticuerpos y polipéptidos descritos en el presente documento, usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento.

En general, las propiedades de unión de un anticuerpo (o fragmento del mismo) con polipéptidos de VIH1 o células o tejidos infectados por VIH1 pueden determinarse y evaluarse usando métodos de inmunodetección incluyendo, por ejemplo, ensayos basados en inmunofluorescencia, tales como inmunohistoquímica (IHC) y/o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los métodos de inmunoensayo pueden incluir controles y procedimientos para determinar si los anticuerpos se unen específicamente con polipéptidos de VIH1 de uno o más clados o cepas específicos de VIH, y no reconocen o reaccionan de forma cruzada con células de control normales.

Después de la pre-exploración de suero para identificar pacientes que producen anticuerpos para un agente infeccioso o polipéptido del mismo, por ejemplo, VIH1, los métodos descritos en el presente documento incluyen típicamente el aislamiento o la purificación de linfocitos B de una muestra biológica previamente obtenida de un paciente o un sujeto. Puede diagnosticarse simultáneamente o previamente que el paciente o sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o infección particular, o puede considerarse que el paciente o sujeto está libre de una enfermedad o infección particular. Típicamente, el paciente o sujeto es un mamífero y, en realizaciones particulares, un ser humano. La muestra biológica puede ser cualquier muestra que contenga linfocitos B, incluyendo pero sin limitación, ganglio linfático o tejido de ganglio linfático, efusiones pleurales, sangre periférica, líquido ascítico, tejido tumoral o líquido cefalorraquídeo (LCR). En diversas realizaciones, se aíslan linfocitos B de diferentes tipos de muestras biológicas, tales como una muestra biológica afectada por una enfermedad o infección particular. Sin embargo, se entiende que puede usarse cualquier muestra biológica que comprenda linfocitos B para cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Una vez aislados, se induce que los linfocitos B produzcan anticuerpos, por ejemplo, cultivando los linfocitos B en condiciones que apoyen la proliferación de linfocitos B o desarrollo a un plasmacito, plasmablasto o célula plasmática. Después se exploran los anticuerpos, típicamente usando técnicas de alto rendimiento, para identificar un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno diana, por ejemplo, un tejido particular, una célula, un agente infeccioso o un polipéptido. En ciertas realizaciones, el antígeno específico, por ejemplo, polipéptido de superficie celular con el que se une el anticuerpo, se desconoce, mientras que en otras realizaciones, se conoce el antígeno con el que se une específicamente el anticuerpo.

En general, pueden aislarse linfocitos B de una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de tumor, tejido, sangre periférica o ganglio linfático, por cualquier medio conocido y disponible en la técnica. Los linfocitos B se clasifican típicamente mediante FACS basándose en la presencia en su superficie de un marcador específico de linfocitos B, por ejemplo, CD19, CD138 y/o IgG de superficie. Sin embargo, pueden emplearse otros métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, purificación en columna usando perlas magnéticas de CD19 o perlas magnéticas específicas de IgG, seguido de elución de la columna. Sin embargo, el aislamiento magnético de linfocitos B utilizando cualquier marcador puede dar como resultado pérdida de ciertos linfocitos B. Por lo tanto, en ciertos ejemplos, las células aisladas no se clasifican sino que, en su lugar, se siembran directamente células mononucleares purificadas por ficol del tumor en el número apropiado o deseado de especificidades por pocillo.

Para identificar linfocitos B que producen un anticuerpo específico de agente infeccioso, los linfocitos B se siembran típicamente a baja densidad (por ejemplo, una única especificidad por pocillo, 1-10 células por pocillo, 10-100 células por pocillo, 1-100 células por pocillo, menos de 10 células por pocillo o menos de 100 células por pocillo) en placas multi-pocillo o de microtitulación, por ejemplo, en configuraciones de 96, 384 o 1536 pocillos. Cuando los linfocitos B se siembran inicialmente a una densidad mayor de una célula por pocillo, entonces los métodos de la presente memoria descriptiva pueden incluir la etapa de diluir posteriormente células en un pocillo identificado como productor de un anticuerpo específico de antígeno, hasta que se consigue una especificidad de una única célula por pocillo, facilitando de este modo la identificación del linfocito B que produce el anticuerpo específico de antígeno. Los sobrenadantes celulares o una parte de los mismos y/o células pueden congelarse y almacenarse para ensayo futuro y posterior recuperación de polinucleótidos de anticuerpos.

En general, los linfocitos B pueden cultivarse en condiciones que favorecen la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Por ejemplo, los linfocitos B pueden cultivarse en condiciones favorables para la proliferación y diferenciación de linfocitos B para producir plasmablastos productores de anticuerpos, plasmacitos o células plasmáticas. En particular, los linfocitos B pueden cultivarse en presencia de un mitógeno de linfocitos B, tal como lipopolisacárido (LPS) o ligando de CD40. En un ejemplo específico, los linfocitos B se diferencian en células productoras de anticuerpos cultivándolos con células alimentadoras y/u otros activadores de linfocitos B, tales como ligando de CD40.

Los sobrenadantes de cultivo celular o anticuerpos obtenidos de los mismos pueden ensayarse con respecto a su

capacidad para unirse con un antígeno diana, usando métodos rutinarios disponibles en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. En particular, los sobrenadantes de cultivo pueden ensayarse con respecto a la presencia de anticuerpos que se unen con un antígeno diana usando métodos de alto rendimiento. Por ejemplo, pueden cultivarse linfocitos B en placas de microtitulación multipocillo, de modo que pueden usarse manipuladores de placas robóticos para tomar simultáneamente muestras de múltiples sobrenadantes celulares y ensayar con respecto a la presencia de anticuerpos que se unen con un antígeno diana. En particular, los antígenos pueden unirse con perlas, por ejemplo, perlas paramagnéticas o de látex) para facilitar la captura de complejos de anticuerpo/antígeno. Además, pueden marcarse con fluorescencia antígenos y anticuerpos (con diferentes marcadores) y puede realizarse análisis de FACS para identificar la presencia de anticuerpos que se unen con el antígeno diana. Por ejemplo, puede determinarse la unión de anticuerpo usando análisis e instrumentación de FMAT™ (Applied Biosystems, Foster City, CA). FMAT™ puede ser una plataforma macro-confocal de fluorescencia para exploración de alto rendimiento, que mezcla y lee ensayos no radiactivos usando células vivas o perlas.

En el contexto de la comparación de la unión de un anticuerpo con un antígeno diana particular (por ejemplo, una muestra biológica tal como tejido o células infectados, o agentes infecciosos) en comparación con una muestra de control (por ejemplo, una muestra biológica tal como células no infectadas, o un agente infeccioso diferente), en diversos ejemplos, se considera que el anticuerpo se une preferentemente con un antígeno diana particular si se unen al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cinco veces o al menos diez veces más anticuerpo con el antígeno diana particular en comparación con la cantidad que se une con una muestra de control.

Pueden aislarse polinucleótidos que codifican cadenas de anticuerpo, regiones variables de las mismas, o fragmentos de las mismas, de células que utilizan cualquier medio disponible en la técnica. Por ejemplo, pueden aislarse polinucleótidos usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo, PCR de transcripción inversa (RT-PCR) usando cebadores oligonucleotídicos que se unen específicamente con secuencias polinucleotídicas que codifican cadena pesada o ligera o complementos de las mismas usando procedimientos rutinarios disponibles en la técnica. Por ejemplo, pueden someterse pocillos positivos a RT-PCR de pocillo completo para amplificar las regiones variables de cadena pesada y ligera de la molécula de IgG expresada por las células plasmáticas descendientes clonales. Estos productos de PCR pueden secuenciarse.

Los productos de PCR resultantes que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera o partes de las mismas se subclonan después en vectores de expresión de anticuerpo humanos y se expresan de forma recombinante según procedimientos rutinarios en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 7.112.439). Las moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo específico de tumor o fragmento del mismo, como se describe en el presente documento, pueden prepararse y expresarse de acuerdo con cualquiera de una diversidad de procedimientos bien conocidos para escisión de ácido nucleico, ligamiento, transformación y transfección. Por lo tanto, en ciertos ejemplos, puede preferirse la expresión de un fragmento de anticuerpo en una célula hospedadora procariota, tal como *Escherichia coli* (véase, por ejemplo, Pluckthun *et al*., Methods Enzymol. 178: 497-515 (1989)). En determinados otros ejemplos, puede preferirse la expresión del anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo en una célula hospedadora eucariota, incluyendo levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*); células animales (incluyendo células de mamífero); o células vegetales. Los ejemplos de células animales adecuadas incluyen, pero sin limitación, mieloma, COS, CHO o células de hibridoma. Los ejemplos de células vegetales incluyen células de tabaco, maíz, soja y arroz. Por métodos conocidos por los expertos habituales en la materia y basados en la presente divulgación, puede diseñarse un vector de ácido nucleico para expresar secuencias ajenas en un sistema de hospedador particular, y después pueden insertarse secuencias polinucleotídicas que codifican el anticuerpo específico de tumor (o fragmento del mismo). Los elementos reguladores variarán según el hospedador particular.

Pueden prepararse uno o más vectores de expresión replicables que contienen un polinucleótido que codifica una región variable y/o constante y usarse para transformar una línea celular apropiada, por ejemplo, una línea celular de mieloma no productora, tal como una línea NSO de ratón o una bacteria, tal como *E. coli*, en la que se producirá la producción del anticuerpo. Para obtener transcripción y traducción eficaz, la secuencia polinucleotídica en cada vector debería incluir secuencias reguladoras apropiadas, particularmente un promotor y una secuencia líder unidos operativamente a la secuencia de región variable. Se conocen bien en general y se usan rutinariamente métodos particulares para producir anticuerpos de esta manera. Por ejemplo, se describen procedimientos de biología molecular en Sambrook *et al*. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989; véase también Sambrook *et al*., 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, (2001)). Aunque no es necesario, en ciertas realizaciones, pueden secuenciarse regiones de polinucleótidos que codifican los anticuerpos recombinantes. Puede realizarse secuenciación de ADN como se describe en Sanger *et al*. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 (1977)) y el manual de secuenciación de Amersham International plc e incluyendo mejoras de los mismos.

En ejemplos particulares, los anticuerpos recombinantes resultantes o fragmentos de los mismos pueden ensayarse para confirmar su especificidad original y pueden ensayarse adicionalmente con respecto a panespecificidad, por ejemplo, con agentes infecciosos relacionados. En particular, un anticuerpo identificado o producido de acuerdo con métodos descritos en el presente documento puede ensayarse con respecto a destrucción de células mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o apoptosis y/o con respecto a su capacidad para

internalizarse.

La presente invención, en otros aspectos, proporciona composiciones polinucleotídicas, en donde estos polinucleótidos codifican el polipéptido de la invención, por ejemplo, una región de una cadena variable del anticuerpo que se une con VIH1. Los polinucleótidos de la invención son moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN monocatenarias (codificantes o antisentido) o bicatenarias. Las moléculas de ARN incluyen, pero sin limitación, moléculas de ARNhn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN una a una y moléculas de ARNm que no contienen intrones. Como alternativa, o además, están presentes secuencias codificantes o no codificantes dentro de un polinucleótido de la presente invención. También como alternativa, o además, un polinucleótido está ligado a otras moléculas y/o materiales de soporte de la invención. Pueden usarse polinucleótidos de la invención, por ejemplo, en ensayos de hibridación para detectar la presencia de un anticuerpo de VIH1 en una muestra biológica, y en la producción recombinante de polipéptidos de la invención. Además, la invención incluye todos los polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido de la presente invención.

Además, pueden proporcionarse variantes polinucleotídicas que tienen identidad sustancial con las secuencias de 1443_C16, 1456_P20, 1460_G14, 1495_C14 o 1496_C09, por ejemplo las que comprenden al menos 70 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más, identidad de secuencia en comparación con una secuencia polinucleotídica de la presente invención, como se determina usando los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, análisis de BLAST usando parámetros convencionales). Un experto en la materia reconocerá que estos valores pueden ajustarse de forma apropiada para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degradación codónica, similitud de aminoácidos, posición de fase de lectura y similares.

Típicamente, las variantes polinucleotídicas contienen una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones, preferentemente de modo que las propiedades de unión inmunogénicas del polipéptido codificado por el polinucleótido variante no disminuye sustancialmente en relación con un polipéptido codificado por una secuencia polinucleotídica expuesta específicamente en el presente documento.

Adicionalmente, la presente invención puede proporcionar fragmentos polinucleotídicos que comprenden diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idénticos a o complementarios de una o más de las secuencias desveladas en el presente documento. Por ejemplo, los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden comprender al menos aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 o 1000 o más nucleótidos contiguos de una o más de las secuencias desveladas en el presente documento así como todas las longitudes intermedias entre ellas. Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión “longitudes intermedias” describe cualquier longitud entre los valores citados, tales como 16, 17, 18, 19, etc. 21, 22, 23, etc. 30, 31, 32, etc. 50, 51, 52, 53, etc. 100, 101, 102, 103, etc. 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los números enteros entre 200-500; 500-1.000 y similares.

Además, pueden proporcionarse composiciones polinucleotídicas que son capaces de hibridar en condiciones de rigurosidad de moderada a alta con una secuencia polinucleotídica proporcionada en el presente documento, o un fragmento de la misma, o a una secuencia complementaria de la misma. Se conocen bien en la técnica de la biología molecular técnicas de hibridación. Para fines de ilustración, las condiciones moderadamente rigurosas adecuadas para ensayar la hibridación de un polinucleótido de la presente invención con otros polinucleótidos incluyen prelavado en una solución de SSC 5X, SDS 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50 ºC-60 ºC, SSC 5 X, durante una noche; seguido de lavado dos veces a 65 ºC durante 20 minutos con cada uno de SSC 2X, 0,5X y 0,2X que contienen SDS 0,1 %. Un experto en la materia entenderá que la rigurosidad de la hibridación puede manipularse fácilmente, tal como alterando el contenido salino de la solución de hibridación y/o la temperatura a la que se realiza la hibridación. Por ejemplo, las condiciones de hibridación altamente rigurosas adecuadas incluyen las descritas anteriormente, con la excepción de que se aumenta la temperatura de hibridación, por ejemplo, hasta 60-65 ºC o 65-70 ºC.

Típicamente, el polipéptido codificado por la variante o el fragmento de polinucleótido tiene la misma especificidad de unión (es decir, se une específica o preferentemente con el mismo epítopo o cepa de VIH) que el polipéptido codificado por el polinucleótido nativo. Por ejemplo, los polinucleótidos descritos anteriormente, por ejemplo, variantes polinucleotídicas, fragmentos y secuencias de hibridación, codifican polipéptidos que tienen un nivel de actividad de unión de al menos aproximadamente 50 %, preferentemente al menos aproximadamente 70 % y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de la de una secuencia polipeptídica expuesta específicamente en el presente documento.

Los polinucleótidos como se desvelan en el presente documento, o fragmentos de los mismos, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiples, otros segmentos codificantes y similares, de modo que su longitud general puede variar considerablemente. Se emplea un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido. Por ejemplo, se incluyen segmentos de polinucleótidos ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 10.000,

aproximadamente 5.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 1.000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases de longitud, y similares (incluyendo todas las longitudes intermedias) en muchas implementaciones de esta invención.

Los expertos en la materia apreciarán que, como resultado de la degradación del código genético, existen múltiples secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos portan homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, se contemplan específicamente en la invención polinucleótidos que codifican un polipéptido de la presente invención pero que varían debido a diferencias en el uso codónico. Además, se contemplan alelos de los genes que incluyen las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden tener, aunque no es necesario que tengan, una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

En general, se realiza mutagénesis de las secuencias polinucleotídicas desveladas para alterar una o más propiedades del polipéptido codificado, tal como su especificidad de unión o fuerza de unión. Se conocen bien en este campo técnicas para mutagénesis, y se usan ampliamente para crear variantes tanto de polipéptidos como de polinucleótidos. Se emplea un enfoque de mutagénesis, tal como mutagénesis específica de sitio, para la preparación de variantes y/o derivados de los polipéptidos descritos en el presente documento. Por este enfoque, se realizan modificaciones específicas en una secuencia polipeptídica mediante mutagénesis de los polinucleótidos subyacentes que los codifican. Estas técnicas proporcionan un enfoque sencillo para preparar y ensayar variantes de secuencia, por ejemplo, incorporar una o más de las consideraciones anteriores, introduciendo uno o más cambios de secuencias de nucleótidos en el polinucleótido.

La mutagénesis específica permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias oligonucleotídicas específicas que incluyen la secuencia de nucleótidos de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño y complejidad de secuencia suficientes para formar una doble cadena estable en ambos lados del punto de unión de supresión que se atraviesa. Se emplean mutaciones en una secuencia polinucleotídica seleccionada para mejorar, alterar, reducir, modificar o cambiar de otro modo las propiedades del polinucleótido en sí mismo y/o alterar las propiedades, actividad, composición, estabilidad o secuencia primaria del polipéptido codificado.

Además, las secuencias polinucleotídicas como se desvelan pueden usarse como sondas o cebadores para hibridación de ácido nucleico, por ejemplo, como cebadores de PCR. La capacidad de dichas sondas de ácido nucleico para hibridar específicamente con una secuencia de interés les permite detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. Sin embargo, también se contemplan otros usos, tales como el uso de la información de secuencia para la preparación de cebadores de especies mutantes, o cebadores para su uso en la preparación de otras construcciones genéticas. Por ejemplo, los segmentos de ácido nucleico que incluyen una región de secuencia de al menos aproximadamente una secuencia contigua de 15 nucleótidos de longitud que tiene la misma secuencia que, o es complementaria de, una secuencia contigua de 15 nucleótidos de longitud como se desvela en el presente documento puede ser particularmente útiles. También pueden usarse secuencias idénticas o complementarias contiguas más largas, por ejemplo, las de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000 (incluyendo todas las longitudes intermedias) incluyendo secuencias de longitud completa, y todas las longitudes entre ellas, en ciertas realizaciones.

Se contemplan particularmente moléculas polinucleotídicas que tienen regiones de secuencia que consisten en tramos de nucleótidos contiguos de 10-14, 15-20, 30, 50 o incluso de 100-200 nucleótidos aproximadamente (incluyendo también longitudes intermedias), idénticas o complementarias de una secuencia polinucleotídica desvelada en el presente documento, como sondas de hibridación para su uso, por ejemplo, en transferencia de Southern y Northern y/o cebadores para su uso, por ejemplo, en reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El tamaño total del fragmento, así como el tamaño del tramo o los tramos complementarios, depende en última instancia del uso pretendido o aplicación del segmento de ácido nucleico particular. Se usan en general fragmentos más pequeños en realizaciones de hibridación, en las que la longitud de la región complementaria contigua puede variar, tal como entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 nucleótidos, pero pueden usarse tramos de complementariedad contiguos mayores, según la longitud de las secuencias complementarias que se deseen detectar.

El uso de una sonda de hibridación de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud permite la formación de una molécula bicatenaria que es tanto estable como selectiva. Se prefieren en general moléculas que tienen secuencias complementarias contiguas sobre tramos mayores de 12 bases de longitud, aunque, para aumentar la estabilidad y selectividad del híbrido, y de este modo mejorar la calidad y el grado de moléculas híbridas específicas obtenidas. Se prefieren en general moléculas de ácido nucleico que tienen tramos de genes complementarios de 15 a 25 nucleótidos contiguos, o incluso más largos cuando se desee.

Se seleccionan sondas de hibridación de cualquier parte de cualquiera de las secuencias desveladas en el presente

documento. Lo único que se requiere es revisar las secuencias expuestas en el presente documento, o cualquier parte continua de las secuencias, de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud hasta e incluyendo la secuencia de longitud completa, que se desee utilizar como una sonda o cebador. La elección de secuencias de sonda y cebador está controlada por diversos factores. Por ejemplo, se desea emplear cebadores cercanos a los extremos de la secuencia total.

Se prepara fácilmente polinucleótido de la presente invención, o fragmentos o variantes de los mismos, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, como se practica habitualmente usando un sintetizador de oligonucleótidos automático. Además, se obtienen fragmentos por aplicación de tecnología de reproducción de ácidos nucleicos, tal como la tecnología de PCR™ de la Patente de Estados Unidos 4.683.202, introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante, y mediante otras técnicas de ADN recombinante conocidas generalmente por los expertos habituales en la materia de biología molecular.

La invención proporciona vectores y células hospedadoras que comprenden un ácido nucleico de la presente invención, así como técnicas recombinantes para la producción de un polipéptido de la presente invención. Los vectores de la invención incluyen los que tienen capacidad de replicación en cualquier tipo de célula u organismo, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, fagos, cósmidos y minicromosomas. En diversas realizaciones, los vectores que comprenden un polinucleótido de la presente invención son vectores adecuados para propagación o replicación del polinucleótido, o vectores adecuados para expresar un polipéptido de la presente invención. Dichos vectores se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado.

Se sintetizan polinucleótidos de la presente invención, completos o en partes que después se combinan, e insertarse en un vector usando técnicas de biología molecular y celular rutinarias, incluyendo, por ejemplo, subclonar el polinucleótido en un vector linealizado usando sitios de restricción y enzimas de restricción apropiados. Se amplifican polinucleótidos de la presente invención mediante reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores oligonucleotídicos complementarios de cada cadena del polinucleótido. Estos cebadores también incluyen sitios de escisión de enzimas de restricción para facilitar la subclonación en un vector. Los componentes de vectores replicables incluyen en general, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación y uno o más genes marcadores o seleccionables.

Para expresar un polipéptido de la presente invención, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, se insertan en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Se usan métodos bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y la traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., *et al*. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., y Ausubel, F. M. *et al*. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York. N. Y.

Se utiliza una diversidad de sistemas de vector de expresión/hospedador para contener y expresar secuencias polinucleotídicas. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, plásmido o vectores de expresión de ADN cosmídicos; levadura transformada con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

Típicamente, las regiones variables de un gen que expresa un anticuerpo monoclonal de interés se amplifican a partir de una célula de hibridoma usando cebadores de nucleótidos. Estos cebadores son sintetizados por un experto habitual en la materia, o pueden obtenerse de fuentes disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, Stratagene (La Jolla, California), que vende cebadores para amplificar regiones variables de ratón y humanas). Los cebadores se usan para amplificar regiones variables de cadena pesada o ligera que después se insertan en vectores tales como ImmunoZAP™ H o ImmunoZAP™ L (Stratagene), respectivamente. Estos vectores se introducen después en sistemas de expresión basados en *E. coli*, levadura o mamíferos. Se producen grandes cantidades de una proteína monocatenaria que contiene una fusión de los dominios V_H y V_L usando estos métodos (véase Bird *et al*., Science 242: 423-426 (1988)).

Los “elementos de control” o las “secuencias reguladoras” presentes en un vector de expresión son las regiones no traducidas del vector, por ejemplo, potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5’ y 3’, que interaccionan con proteínas celulares hospedadoras para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y hospedador utilizado, puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles.

Los ejemplos de promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor phoA, sistemas promotores de β-lactamasa y lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano

(trp) y promotores híbridos tales como el promotor de tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contienen habitualmente una secuencia de Shine-Dalgarno unida operativamente con el ADN que codifica el polipéptido. Se usan promotores inducibles tales como el promotor de lacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, CA) o plásmido pSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) y similares.

Se conoce una diversidad de secuencias promotoras para eucariotas y se puede usar cualquiera de acuerdo con la presente memoria descriptiva. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región de CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucariotas.

En sistemas de células de mamífero, se prefieren en general promotores de genes de mamífero o de virus de mamífero. La expresión de polipéptidos de vectores en células hospedadoras de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (por ejemplo, Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina y de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, pueden usarse provechosamente vectores basados en SV40 o VEB con un marcador seleccionable apropiado. Un ejemplo de un vector de expresión adecuado es pcDNA-3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), que incluye un promotor de CMV.

Están disponibles varios sistemas de expresión basados en virus para expresión de polipéptidos en mamíferos. Por ejemplo, en casos en los que se use un adenovirus como en vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden ligarse en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en la secuencia de promotor tardío y líder tripartito. Puede usarse inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma vírico para obtener un virus viable que es capaz de expresar el polipéptido en células hospedadoras infectadas (Logan, J. y Shenk, T. 1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 3655-3659). Además, pueden usarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (VSR), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

En sistemas bacterianos, puede seleccionarse cualquiera de varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se deseen grandes cantidades, se usan vectores que dirigen la expresión a alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, los vectores de clonación y expresión de *E. coli* multifuncionales tales como escritura BLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia que codifica el polipéptido de interés puede ligarse en el vector en fase con secuencias para la Met amino terminal y los 7 restos posteriores de β-galactosidasa, de modo que se produzca una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke, G. y S. M. Schuster (1989) J. Biol Chem 264: 5503-5509); y similares. También se usan vectores pGEX (Promega, Madison, WI) para expresar polipéptidos ajenos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción a perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Se diseñan proteínas preparadas en dichos sistemas para incluir heparina, trombina o sitios de escisión de proteasa del factor XA de modo que el polipéptido clonado de interés pueda liberarse del resto de GST a voluntad.

En la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, se usan varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH. Los ejemplos de otras secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Para revisiones, véase Ausubel *et al*. (mencionado anteriormente) y Grant *et al*. (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544. Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento incluyen las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para su uso en expresión de levaduras en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan provechosamente con promotores de levadura.

En casos en los que se usen vectores de expresión vegetales, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos está conducida por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, se usan promotores víricos tales como los promotores 35S y 19S de CaMV solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu, N.

(1987) EMBO J. 6: 307-311). Como alternativa, se usan promotores vegetales tales como la subunidad pequeña de la RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi, G. *et al*. (1984) EMBO J. 3: 1671-1680; Broglie, R. *et al*. (1984) Science 224: 838-843; y Winter, J., *et al*. (1991) Results Probl. Cell Differ. 17: 85-105). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales mediante transformación de ADN directa o transfección mediada por patógenos. Dichas técnicas se describen en varias revisiones disponibles en general (véase, por ejemplo, Hobbs, S. o Murry, L. E. en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, Nueva York, N. Y.; pp. 191-196).

También se usa un sistema de insecto para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de dichos sistemas, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes ajenos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido se clonan en una región no esencial del virus, tal como el gen de la poliedrina, y se colocan bajo el control del promotor de la poliedrina. La inserción con éxito de la secuencia codificante de polipéptido hace al gen de la poliedrina inactivo y produce virus recombinante que carece de proteína de la envoltura. Los virus recombinantes se usan después para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia*, en las que el polipéptido de interés se expresa (Engelhard, E. K. *et al*. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3224-3227).

También se usan señales de inicio específicas para conseguir una traducción más eficaz de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Dichas señales incluyen el codón de inicio de ATG y secuencias adyacentes. En casos en los que se inserten secuencias que codifican el polipéptido, su codón de inicio y secuencias cadena arriba en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de la transcripción o la traducción adicionales. Además, en casos en los que solamente se inserte secuencia codificante, o una parte de la misma, se proporcionan señales de control de la traducción exógenas que incluyen el codón de inicio de ATG. Además, el codón de inicio está en la fase de lectura correcta para asegurar la traducción correcta del polinucleótido insertado. Los elementos de traducción exógenos y codones de inicio son de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos.

La transcripción de un ADN que codifica un polipéptido de la memoria descriptiva se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen muchas secuencias potenciadoras, incluyendo, por ejemplo, las identificadas en genes que codifican globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina. Típicamente, sin embargo, se usa un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para activación de promotores eucariotas. El potenciador se corta y empalma en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o nucleados de otros organismos multicelulares) típicamente también contienen secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica anticuerpo anti PSCA. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

Son células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento, células procariotas, de levadura, vegetales o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los ejemplos de procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia,* por ejemplo, *E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella,* por ejemplo *Salmonella typhimurium, Serratia,* por ejemplo *Serratia marcescans* y *Shigella,* así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

Saccharomyces cerevisiae, o la levadura de panadero común, es el microorganismo hospedador eucariota inferior más habitualmente usado. Sin embargo, están disponibles habitualmente y se usan en el presente documento varios otros géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis, K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris.* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger.*

En ciertas realizaciones, una cepa de célula hospedadora se elige por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional que escinde una forma "prepro" de la proteína también se usa para facilitar la inserción, el plegamiento y/o la función correcta. Se eligen diferentes células hospedadoras tales como CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293 y WI38 que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales, para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína ajena.

También se conocen y están disponibles en la técnica métodos y reactivos específicamente adaptados para la expresión de anticuerpos o fragmentos de los mismos, incluyendo los descritos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 4816567 y 6331415. En diversas realizaciones, se expresan cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo, o fragmentos de las mismas, a partir de los mismos vectores de expresión o vectores de expresión separados. En una realización, ambas cadenas se expresan en la misma célula, facilitando de este modo la formación de un anticuerpo funcional o fragmento del mismo.

Se producen anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpo en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí solo muestra eficacia en destrucción de células infectadas. Para la expresión de fragmentos y polipéptidos de anticuerpos en bacterias, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523, que describen regiones de inicio de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y puede purificarse mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo usando un proceso similar al usado para purificar el anticuerpo expresado por ejemplo en células CHO.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos y anticuerpos glucosilados se obtienen de organismos multicelulares. Los ejemplos de células invertebradas incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y células hospedadoras de insectos permisivos correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopicius* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles públicamente una diversidad de cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori* y estos virus se usan como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda.* También se utilizan como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

La memoria descriptiva abarca métodos de propagación de polipéptidos de anticuerpos y fragmentos de los mismos en células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular). Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero que pueden usarse en los métodos de la memoria descriptiva la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al*., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de cercopiteco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather *et al*., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de polipéptidos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Para producción de alto rendimiento, a largo plazo, de proteínas recombinantes, se prefiere en general la expresión estable. Por ejemplo, se transforman líneas celulares que expresan de forma estable un polinucleótido de interés usando vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo vector o en uno separado. Después de la introducción del vector, se permite que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse a medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia a selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Se hace proliferar a los clones resistentes de células transformadas de forma estable usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo celular.

Se usa una pluralidad de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler, M. *et al*. (1977) Cell 11: 223-32) y de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, I. *et al*. (1990) Cell 22: 817-23) que se emplean en células tk^- o $aprt^-$

respectivamente. Además, se usa resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como la base para selección; por ejemplo, dhfr, que contiene resistencia a metotrexato (Wigler, M. *et al*. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin, F. *et al*. (1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14); y als o pat, que confieren resistencia a clorsulfurón y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, mencionado anteriormente). Se han descrito genes seleccionables adicionales. Por ejemplo, trpB permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, e hisD permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, S. C. y R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8047-51). El uso de marcadores visibles se ha popularizado con marcadores tales como antocianinas, beta-glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, que es usado ampliamente no solamente para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes, C. A. *et al*. (1995) Methods Mol. Biol. 55: 121-131).

Aunque la presencia/ausencia de expresión de gen marcador sugiere que el gen de interés también está presente, se confirma su presencia y expresión. Por ejemplo, si la secuencia que codifica un polipéptido está insertada dentro de una secuencia de gen marcador, se identifican células recombinantes que contiene secuencias mediante la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, se coloca un gen marcador en tándem con una secuencia codificante de polipéptido bajo el control de un único promotor. La expresión del gen marcador en respuesta a inducción o selección indica habitualmente la expresión del gen en tándem también.

Como alternativa, se identifican células hospedadoras que contienen y expresan una secuencia polinucleotídica deseada por una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, hibridaciones de ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioensayo o inmunoensayo de proteínas que incluyen, por ejemplo, tecnologías basadas en membrana, solución o microplacas para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína.

Se conocen en la técnica una diversidad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos no limitantes incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en monoclonal, de dos sitios, utilizando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítopos no interferentes en un polipéptido dado para algunas aplicaciones, pero también se puede emplear un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros sitios, en Hampton, R. *et al*. (1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul. Minn.) y Maddox, D. E. *et al*. (1983; J. Exp. Med. 158: 1211-1216).

Los expertos en la materia conocen diversos marcadores y técnicas de conjugación y estos se usan en diversos ensayos de ácido nucleico y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada o sondas de PCR para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos incluyen oligomarcaje, traslación de muescas, marcaje de extremos o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Como alternativa, las secuencias, o cualquier parte de las mismas se clonan en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Dichos vectores se conocen en la técnica, están disponibles en el mercado y se usan para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos se realizan usando una diversidad de kits disponibles en el mercado. Las moléculas o los marcadores indicadores adecuados que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

El polipéptido producto por una célula recombinante se secreta o está contenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Los vectores de expresión que contienen polinucleótidos de la invención se diseñan para contener secuencias señal que dirige la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana de células procariotas o eucariotas.

En general, puede producirse un polipéptido como se desvela en el presente documento como un polipéptido de fusión que incluye además un domino polipeptídico que facilita la purificación de proteínas solubles. Dichos dominios facilitadores de la purificación incluyen, pero sin limitación, péptidos quelantes metálicos tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de extensión de FLAGS/purificación de afinidad (Amgen, Seattle, WA). La inclusión de secuencias enlazadoras escindibles tales como las específicas para Factor XA o enteroquinasa (Invitrogen. San Diego, CA) entre el dominio de purificación y el polipéptido codificado se usa para facilitar la purificación. Un vector de expresión ejemplar posibilita la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de interés y un ácido nucleico que codifica 6 restos de histidina que preceden a una tiorredoxina o un sitio de escisión de enteroquinasa. Los restos de histidina facilitan la purificación en IMIAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados) como se describe en Porath, J. *et al*. (1992, Prot. Exp. Purif. 3: 263-281) mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido deseado a partir de la proteína de fusión. Se proporciona un análisis de vectores usados para producción de proteínas de fusión en Kroll, D. J. *et al*. (1993; DNA Cell Biol. 12: 441-453).

Por ejemplo, un polipéptido como se desvela en el presente documento puede fusionarse con un polipéptido

heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura o el polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas, la secuencia señal se selecciona, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, 1pp o líderes de enterotoxina II termoestables. Para secreción de levadura, la secuencia señal se selecciona de, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, líder de factor α (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamíferos así como líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal de gD del herpes simple.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el polipéptido o el anticuerpo se produce de forma intracelular, en el espacio periplásmico o se secreta directamente al medio. Si el polipéptido o anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo en partículas, bien en células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retira, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al*., Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli.* Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Se retira el residuo celular por centrifugación. Cuando el polipéptido o anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en general primero usando un filtro de concentración de proteína disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Opcionalmente, se incluye un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se incluyen antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de polipéptido o anticuerpo preparada a partir de las células se purifica usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La conveniencia de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el polipéptido o anticuerpo. Se usa proteína A para purificar anticuerpos o fragmentos de los mismos que se basan en cadenas pesadas γ_1, γ_2 o γ_4 humanas (Lindmark *et al*., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para γ_3 humana (Guss *et al*., EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de tamaño de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el polipéptido o anticuerpo comprende un dominio C_H 3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para purificación. Están disponibles también otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del polipéptido o anticuerpo para recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el polipéptido o anticuerpo de interés y contaminantes se somete a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizada a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

La invención incluye además formulaciones farmacéuticas que incluyen un polipéptido, anticuerpo o modulador de la presente invención, a un grado de pureza deseado, y un vehículo, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable (Remingion's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)). En ciertas realizaciones, se preparan formulaciones farmacéuticas para potenciar la estabilidad del polipéptido o anticuerpo durante el almacenamiento, por ejemplo, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, por ejemplo, tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tonificantes tales como trehalosa y cloruro de sodio; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivos tales como polisorbato; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En ciertas realizaciones, la formulación terapéutica conviene preferentemente el polipéptido o anticuerpo a una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferentemente entre 10-100 mg/ml.

Las formulaciones del presente documento pueden contener uno o más agentes terapéuticos adicionales adecuados para el tratamiento de la indicación particular, por ejemplo, infección que se trate, o para prevenir efectos secundarios no deseados. Preferentemente, el agente terapéutico adicional tiene una actividad complementaria del polipéptido o anticuerpo de la presente invención, y los dos no se afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, además del polipéptido o anticuerpo de la invención, se añade a la formulación un anticuerpo adicional o secundario, agente antivírico, agente antiinfeccioso y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes convenientemente en la formulación farmacéutica en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos, por ejemplo, polipéptidos y anticuerpos de la invención y otros agentes terapéuticos, también están inmovilizados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y polimetilmetacrilato, respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remingion's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se preparan preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos no limitantes de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroexietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γetil-L-glutamato, etilenvinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* son preferentemente estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril.

El anticuerpo de la invención puede acoplarse a un fármaco para suministro a un sitio de tratamiento o acoplarse a un marcador detectable para facilitar la captura de imágenes de un sitio que comprende células de interés, tales como células infectadas con VIH. Se conocen bien en la técnica métodos para acoplar anticuerpos con fármacos y marcadores detectables, así como métodos para capturar imágenes usando marcadores detectables. Pueden emplearse anticuerpos marcados en una amplia diversidad de ensayos, empleando una amplia diversidad de marcadores. La detección de la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno entre el anticuerpo de la invención y un epítopo de interés (un epítopo de VIH) puede facilitarse uniendo una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de marcadores tales como radionucleótidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriacinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aecuorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S o ^{3}H. Dichos reactivos marcados pueden usarse en una diversidad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes y similares.

Los anticuerpos se marcan con dichos marcadores por métodos conocidos. Por ejemplo, se usan agentes de acoplamiento tales como aldehídos, carbodiimidas, dimaleimida, imidatos, succinimidas, benzadina bis-diazotizada y similares para marcar los anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos anteriormente descritos. Una enzima se combina típicamente con un anticuerpo usando moléculas de enlaces tales como carbodiimidas, peryodato, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Se describen diversas técnicas de marcaje en Morrison, Methods in Enzymology 32b, 103 (1974), Syvanen *et al*., J. Biol. Chem. 284, 3762 (1973) y Bolton y Hunter, Biochem J. 133, 529(1973).

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, un agente terapéutico, o un ion metálico radiactivo o radioisótopo. Los ejemplos de radioisótopos incluyen, pero sin limitación, 1-131, 1-123, 1-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Dichos conjugados de anticuerpos pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada; el resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica.

Se conocen bien técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos con anticuerpos. Véase, por ejemplo, Arnon *et al*. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld *et al*. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom *et al*. (1987) "Antibodies for Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery, ed. Robinson *et al*. (2ª ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985)

"Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera *et al*. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milán, Italia, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin *et al*. (Academic Press, Nueva York, 1985), pp. 303-316; y Thorpe *et al*. (1982) Immunol. Rev. 62: 119-158.

Los métodos de diagnóstico generalmente implican poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente, tal como, por ejemplo, sangre, suero, saliva, orina, esputo, una muestra de hisopo celular o una biopsia tisular, con un anticuerpo de VIH 1 y determinar si el anticuerpo se une preferentemente con la muestra en comparación con una muestra de control o un valor de punto de corte predeterminado, indicando de este modo la presencia de células infectadas. Por ejemplo, se unen al menos dos veces, tres veces o cinco veces más anticuerpo de VIH1 con una célula infectada en comparación con una muestra celular o tisular normal de control apropiada. Se determina un valor de punto de corte predeterminado, por ejemplo, promediando la cantidad de anticuerpo de VIH1 que se une con varias muestras de control apropiadas diferentes en las mismas condiciones usadas para realizar el ensayo de diagnóstico de la muestra biológica que se ensaya.

Se detecta anticuerpo unido usando procedimientos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos de diagnóstico se practican usando anticuerpos de VIH1 que se conjugan con un marcador detectable, por ejemplo, un fluoróforo, para facilitar la detección de anticuerpo unido. Sin embargo, también se practican usando métodos de detección secundaria del anticuerpo de VIH1. Estos incluyen, por ejemplo, RIA, ELISA, precipitación, aglutinación, fijación de complemento e inmunofluorescencia.

Los anticuerpos de VIH1 de la presente invención pueden ser capaces de diferenciar entre pacientes con y pacientes sin una infección por VIH, y determinar si un paciente tiene o no una infección, usando los ensayos representativos proporcionados en el presente documento. De acuerdo con un método, se obtiene una muestra biológica de un paciente que se sospecha que tiene o se sabe que tiene infección por VIH1. Por ejemplo, la muestra biológica incluye células del paciente. La muestra se pone en contacto con un anticuerpo de VIH1, por ejemplo, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el anticuerpo de VIH1 se una con células infectadas presentes en la muestra. Por ejemplo, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo de VIH1 durante 10 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 3 días o cualquier punto intermedio. La cantidad de anticuerpo de VIH1 unido se determina y se compara con un valor de control, que puede ser, por ejemplo, un valor predeterminado o un valor determinado a partir de una muestra tisular normal. Una cantidad aumentada de anticuerpo unido a la muestra del paciente en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de células infectadas en la muestra del paciente.

En un método relacionado, se pone en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente con un anticuerpo de VIH1 durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el anticuerpo se una con células infectadas. Después se detecta el anticuerpo unido, y la presencia de anticuerpo unido indica que la muestra contiene células infectadas. Esto es particularmente útil cuando el anticuerpo de VIH1 no se une con células normales a un nivel detectable.

Diferentes anticuerpos de VIH1 poseen diferentes características de unión y especificidad. Dependiendo de estas características, se usan anticuerpos de VIH1 particulares para detectar la presencia de una o más cepas de VIH1. Por ejemplo, ciertos anticuerpos se unen específicamente con una o varias cepas de VIH1, mientras que otros se unen con todas o una mayoría de diferentes cepas de VIH1. Se usan anticuerpos específicos para una única cepa de VIH1 para identificar la cepa de una infección.

En general, los anticuerpos que se unen con una célula infectada generan preferentemente una señal que indica la presencia de una infección en al menos aproximadamente 20 % de pacientes con la infección que se detecta, más preferentemente al menos aproximadamente 30 % de pacientes. Como alternativa, o además, el anticuerpo genera una señal negativa que indica la ausencia de la infección en al menos aproximadamente 90 % de individuos sin la infección que se detecta. Cada anticuerpo satisface los criterios anteriores; sin embargo, pueden usarse anticuerpos de la presente memoria descriptiva en combinación para mejorar la sensibilidad.

La memoria descriptiva también muestra kits útiles para realizar ensayos de diagnóstico y pronóstico usando los anticuerpos de la memoria descriptiva. Los kits incluyen en general un recipiente adecuado que comprende un anticuerpo de VIH1 de la invención en forma marcada o no marcada. Además, cuando el anticuerpo se proporciona en una forma marcada adecuada para un ensayo de unión indirecto, el kit incluye además reactivos para realizar el ensayo indirecto apropiado. Por ejemplo, el kit incluye uno o más recipientes adecuados que incluyen sustratos enzimáticos o agentes de derivatización, dependiendo de la naturaleza del marcador. También se incluyen muestras de control y/o instrucciones.

Se ha demostrado que la inmunización pasiva es una estrategia eficaz y segura para la prevención y el tratamiento de enfermedades víricas. (Véase Keller *et al*., Clin. Microbiol. Rev. 13: 602-14 (2000); Casadevall, Nat. Biotechnol. 20: 114 (2002); Shibata *et al*., Nat. Med. 5: 204-10 (1999); e Igarashi *et al*., Nat. Med. 5: 211-16 (1999)). La inmunización pasiva usando anticuerpos monoclonales humanos proporciona una estrategia de tratamiento

inmediata para profilaxis de emergencia y tratamiento del VIH1.

Los anticuerpos del VIH1 y fragmentos de los mismos, y composiciones terapéuticas, de la invención se unen específicamente o se unen preferentemente con células infectadas, en comparación con células y tejido no infectados de control normales. Por lo tanto, estos anticuerpos de VIH1 se usan para dirigirse selectivamente a células o tejidos infectados en un paciente, una muestra biológica o una población celular. A la luz de las propiedades de unión específicas de infección de estos anticuerpos, la presente invención proporciona métodos para regular (por ejemplo, inhibir) el crecimiento de células infectadas, métodos para destruir células infectadas y métodos para inducir apoptosis de células infectadas. Estos métodos incluyen poner en contacto una célula infectada con un anticuerpo de VIH1 de la invención. Estos métodos se practican *in vitro, ex vivo* e *in vivo.*

En diversas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden ser intrínsecamente terapéuticamente activos. Como alternativa, o además, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con un agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento, por ejemplo, un radioisótopo o una toxina que se usa en el tratamiento de células infectadas que se unen con o entran en contacto con el anticuerpo.

Los sujetos en riesgo de enfermedades o trastornos relacionados por VIH1 incluyen pacientes que han entrado en contacto con una persona infectada o que se han expuesto al VIH1 de alguna otra manera. La administración de un agente profiláctico puede realizarse antes de la manifestación de síntomas característicos de enfermedad o trastorno relacionado con VIH1, de modo que se prevenga o, como alternativa, se retarde la progresión de una enfermedad o un trastorno.

Se proporcionan además métodos para prevenir un aumento en el título de virus VIH1, replicación del virus, proliferación del virus o una cantidad de una proteína vírica de VIH1 en un sujeto. En una realización, un método incluye administrar al sujeto una cantidad de un anticuerpo de VIH1 eficaz para prevenir un aumento en el título de VIH1, replicación del virus o una cantidad de una proteína de VIH1 de una o más cepas de VIH o aislados en el sujeto.

Para el tratamiento *in vivo* de pacientes humanos y no humanos, se administra o se proporciona habitualmente al paciente una formulación farmacéutica que incluye un anticuerpo de VIH1 de la invención. Cuando se usa para terapia *in vivo*, los anticuerpos de la invención se administran al paciente en cantidades terapéuticamente eficaces, (es decir, cantidades que eliminan o reducen la carga vírica del paciente). Los anticuerpos se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, intracefalorraquídea, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. Los anticuerpos pueden administrarse por vía parental, cuando sea posible, en el sitio de célula diana o por vía intravenosa. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo en determinadas realizaciones. Las composiciones terapéuticas de la invención se pueden administrar a un paciente o a un sujeto por vía sistémica, parenteral o local.

Para administración parental, los anticuerpos se formulan en una forma farmacéutica unitaria inyectable (solución, suspensión, emulsión) en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, parenteral. Son ejemplos de dichos vehículos agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5 %. También se usan vehículos no acuosos tales como aceites fijos y etil oleato. Se usan liposomas como vehículos. El vehículo contiene cantidades menores de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química, por ejemplo, tampones y conservantes. Los anticuerpos se formulan típicamente en dichos vehículos a concentraciones de aproximadamente 1 mg/ml a 10 mg/ml.

La dosis y el régimen de dosificación dependen de una diversidad de factores fácilmente determinados por un médico, tal como la naturaleza de la infección y las características del agente citotóxico particular o agente inhibidor del crecimiento conjugado con el anticuerpo (cuando se use), por ejemplo, su índice terapéutico, el paciente y el historial del paciente. En general, se administra a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo. Por ejemplo, la cantidad de anticuerpo administrado puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg del peso corporal del paciente. Dependiente del tipo y gravedad de la infección, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) del anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, por ejemplo, bien mediante una o más administraciones separadas, o bien mediante infusión continua. El progreso de esta terapia puede supervisarse fácilmente mediante métodos y ensayos convencionales y basándose en criterios conocidos por el médico u otras personas expertas en la materia.

Por ejemplo, puede administrarse al paciente un inmunoconjugado que incluye el anticuerpo conjugado con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunoconjugado es internalizado por la célula, dando como resultado eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la destrucción de la célula con la que se une. Por ejemplo, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con el ácido nucleico en la célula infectada. Se han descrito anteriormente ejemplos de dichos agentes citotóxicos, e incluyen, pero sin limitación, maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

Otros regímenes terapéuticos se combinan con la administración del anticuerpo de VIH1 de la presente invención. La administración combinada incluye co-administración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente hay un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferentemente dicha terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico.

En ciertas realizaciones, es deseable combinar la administración del anticuerpo de la invención con otro anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado con el agente infeccioso.

Además de la administración de la proteína de anticuerpo al paciente, la invención proporciona métodos de administración del anticuerpo por terapia génica. Dicha administración de ácido nucleico que codifica el anticuerpo está abarcada por la expresión “administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo”. Véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de PCT WO96/07321 con respecto al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Además, pueden usarse anticuerpos anti-VIH1 como se desvela en el presente documento para determinar la estructura de antígeno unido, por ejemplo, epítopos conformacionales, cuya estructura se usa después para desarrollar una vacuna que tenga o imite esta estructura, por ejemplo, mediante métodos de modelación química y SAR. Dicha vacuna podría después usarse para prevenir la infección por VIH1.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deberían apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos a continuación representan técnicas que el inventor ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de muestra de paciente

Se exploró suero de aproximadamente 1.800 donantes infectados por VIH1 de Asia, Australia, Europa, Norteamérica y países de África Subsahariana con respecto a actividad de neutralización y se identificaron donantes que muestran una de las actividades de suero neutralizante más amplia y más potente observada hasta ahora. (Simek, M.D., J Virol (2009)). Se generaron anticuerpos monoclonales a partir de estos donantes usando diferentes enfoques.

Se seleccionó un paciente basándose en la elegibilidad del paciente para su inclusión, que se definió como: hombre o mujer de al menos 18 años de edad con infección por VIH documentada durante al menos tres años, clínicamente asintomático en el momento de la inclusión y que no recibe en la actualidad terapia antirretrovírica (Simek, M.D., J Virol (jul 2009) 83(14): 7337-48). La selección de individuos para generación de anticuerpos monoclonales se basó en un algoritmo de exploración analítico de alto rendimiento de orden de rango. El voluntario se identificó como un individuo con suero neutralizante amplio basándose en actividad neutralizante amplia y potente frente a un panel de pseudovirus de diferentes clados.

Se usó una nueva estrategia de alto rendimiento para explorar sobrenadantes de cultivo que contienen IgG de aproximadamente 30.000 linfocitos B de memoria activados de un donante infectado por clado A para unión de $gp120_{JR\text{-}CSF}$ y $gp41_{HxB2}$ (Env) monoméricos, recombinantes, así como actividad de neutralización contra $VIH\text{-}1_{JR\text{-}CSF}$ y $VIH\text{-}1_{SF162}$ como se muestra en la Tabla 1. Los linfocitos B de memoria se cultivaron a densidad casi clonal de modo que pudiera reconstituirse de cada pocillo de cultivo el auténtico par de cadena pesada y ligera del anticuerpo.

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos monoclonales

La plataforma de descubrimiento de anticuerpos monoclonales humana utilizó un sistema de cultivo de linfocitos B a corto plazo para consultar el reportorio de linfocitos B de memoria. Se aislaron 30.300 linfocitos B de memoria que expresaban IgG de superficie y $CD19^+$ de diez millones de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del donante infectado por VIH1. Después se sembraron linfocitos B $CD19^+/sIgG^+$ en placas de microtitulación de 384 pocillos a un promedio de 1,3 células/pocillo en condiciones que promovieron la activación, proliferación, diferenciación terminal y secreción de anticuerpos de linfocitos B. Los sobrenadantes de cultivo se exploraron en un formato de alto rendimiento con respecto a reactividad de unión con gp120 y gp41 recombinantes inmovilizados indirecta y directamente en placas de ELISA, respectivamente. En paralelo, los sobrenadantes de cultivo también se exploraron con respecto a actividad de neutralización en un ensayo de micro-neutralización de alto rendimiento.

Se aislaron regiones variables pesadas y ligeras de lisados de aciertos de neutralización seleccionados mediante amplificación por RT-PCR usando conjuntos de cebadores específicos de familia. A partir de reacciones de PCR específicas de familia positivas, se clonaron grupos de los clones de región VH o VL en un vector de expresión corriente arriba de la secuencia de dominio constante de IgG1 humana. Se combinaron minipreps (QIAGEN, Valencia, CA) de estos grupos de ADN, derivados de cultivos bacterianos en suspensión, en todos los pares

específicos de familia de cadena pesada y ligera posibles y se usaron para transfectar transitoriamente células 293. Todos los sobrenadantes transfectantes que contenían anticuerpos recombinantes secretados se exploraron en ELISA y ensayos de neutralización. Para pocillos de linfocitos B que contenían más de un clon de linfocito B por pocillo de cultivo, se aislaron múltiples secuencias de dominio VH y VL. ELISA (para pocillos de linfocitos B positivos para ELISA) y exploraciones de neutralización identificaron los grupos de combinación de cadena pesada y ligera que reconstituyeron la actividad de unión y neutralización como se observa para el pocillo de linfocitos B. Se confirmaron secuencias de ADN de las regiones variables de cadena pesada y ligera para todos los mAb neutralizantes por múltiples reacciones de secuenciación usando ADN purificado de maxiprep (QIAGEN).

Ejemplo 3: Exploración de anticuerpos monoclonales con respecto a unión con gp120 y gp41 recombinantes mediante ensayo de ELISA

Se obtuvo gp120 recombinante con secuencia derivada de gp120 del aislado de VIH-1 primario JR-CSF y expresada en células de insecto del depósito de IAVI NAC. El gp41 recombinante generado con secuencias derivadas del clon HxB2 de VIH-1 y expresado en *Pichia pastoris* fue fabricado por Vybion, Inc., obtenido del depósito IAVI NAC. Se obtuvieron anticuerpos de oveja anti-gp20 usados como agente de captura para inmovilizar indirectamente gp120 en placas de ELISA de Aalto Bio Reagents (Dublín, Irlanda). Todos los ensayos de ELISA se realizaron a 25 µl/pocillo en placas MaxiSorp de Nunc.

En ELISA anti-gp120, se capturó gp120 recombinante (0,5 µg/ml) en placas de ELISA de 384 pocillos pre-recubiertas (a 4 ºC durante una noche) con anti-gp120 de cabra (5 µg/ml) en tampón de ensayo que contenía BSA (PBS con Tween-20 al 0,05 %) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de retirarse el exceso de gp120 y lavar las placas tres veces con tampón de ensayo, se añadieron sobrenadantes de cultivo de linfocitos B diluidos 5 veces para incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados en tampón de ensayo, se añadió Fc de cabra anti-Ig humana conjugado con HRP secundario en tampón de ensayo que contenía BSA y se incubó durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Se usó sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para desarrollar las lecturas colorimétricas después de lavar las placas de ELISA 3 veces.

Para ELISA anti-gp41, se inmovilizó gp41 recombinante directamente en placas de ELISA de 384 pocillos añadiendo 1 µg/ml e incubando a 4 ºC durante una noche, seguido de bloqueo con tampón de ensayo que contenía BSA. El resto del protocolo de ensayo fue similar al de ELISA anti-gp120.

Los aciertos del ensayo de ELISA se identificaron en una exploración sencilla basándose en valores de densidad óptica (DO) por encima de 3 veces el fondo del ensayo. Se incluyó una curva patrón de valoración en serie de anticuerpo de control en cada placa.

Ejemplo 4: Ensayo de neutralización para exploración de anticuerpos contra virus VIH pseudotipificados

El enfoque de ensayo de neutralización se ha descrito previamente (Binley JM, *et al*. (2004). Comprehensive Cross-Clade Neutralization Analysis of a Panel of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Monoclonal Antibodies. J. Virol. 78: 13232-13252) y se ha modificado y normalizado con respecto a implementación en un formato de 384 pocillos.

Se realizó neutralización por anticuerpos monoclonales y sueros de pacientes usando un único ciclo de ensayo de pseudovirus de replicación. (Richman, D.D., *et al*. Proc Natl Acad Sci USA 100, 4144-4149 (2003)). Se realizaron ensayos de neutralización de pseudovirus usando mutantes de alanina de VIH-1_{JR-CSF} como se describe en Pantophlet, R., *et al*. J Virol 77, 642-658 (2003). Se midió la actividad de neutralización como una reducción de la infecciosidad vírica en comparación con un control sin anticuerpos usando un ensayo de TZM-BL (Li, M., *et al*., J Virol 79, 10108-10125 (2005)). Se realizaron ensayos de neutralización de anticuerpos monoclonales usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activadas por fitohemaglutinina aisladas de tres donantes humanos sanos como células diana como se describe en G. *et al*, (1993) J. Infect. Dis. 168: 207-210; Polonis, V. *et al*, (2001) AIDS Res. Hum. Retroviruses 17: 69-79. Se exploraron sobrenadantes de linfocitos B de memoria en un ensayo de micro-neutralización contra VIH-1_{SF162}, VIH-1_{JR-CSF} y VIS_{mac239} (control negativo). Este ensayo se basó en el ensayo de neutralización de VIH-1 pseudotipificado de 96 pocillos (Monogram Biosciences) y se modificó para explorar sobrenadantes de cultivo de linfocitos B de 15 µl en un formato de 384 pocillos.

Se generaron virus pseudotipificados de aislados de SF162 y JR-CSF de VIH-1 y VIS mac239 (virus de control) cotransfectando células de Riñón Embrionario Humano (células 293) con 2 plásmidos que codifican la secuencia de ADNc de la Envoltura y el resto del genoma de VIH por separado. En el vector que codificaba el genoma del VIH, el gen de Env se reemplazó por el gen de luciferasa de la luciérnaga. Se co-incubaron sobrenadantes transfectantes que contenían virus pseudotipificado durante una noche (18 horas) con sobrenadantes de linfocitos B derivados de la activación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) primarias de un donante infectado. Se añadieron células U87 transfectadas de forma estable con y que expresaban CD4 más los correceptores CCR5 y CXCR4 a la mezcla y se incubaron durante 3 días a 37 ºC. Las células infectadas se cuantificaron por luminometría. Se usó VISmac239 como el virus de control negativo.

El índice de neutralización se expresó como la relación de unidades de luminiscencia relativas (ULR) normalizadas de la cepa vírica de ensayo con la del virus de control VISmac239 derivado del mismo sobrenadante de cultivo de linfocitos B de ensayo. Los valores de punto de corte usados para distinguir aciertos de neutralización se determinaron por el índice de neutralización de un gran número de “pocillos de control negativos” que contenían sobrenadantes de cultivo de linfocitos B derivados de donantes sanos. La tasa de falso positivo usando el valor de punto de corte de 1,5 fue muy baja (1-3 %; Figura 5A) y se redujo hasta cero si se usó el valor de punto de corte de 2,0 (Figura 5B).

La Figura 5 resume los resultados de exploración a partir de los que se seleccionaron cultivos de linfocitos B para rescate de anticuerpos y se obtuvieron los anticuerpos monoclonales 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14). Los resultados revelan que la mayoría de sobrenadantes de cultivo de linfocitos B neutralizantes no tenían reactividad de unión con proteínas gp120 o gp41 recombinantes solubles.

La Tabla 15 muestra los resultados de exploración de los anticuerpos monoclonales 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14) durante el transcurso de su identificación en el método descrito en la presente invención. Se ilustran la actividad de neutralización de cada anticuerpo y su reactividad de unión correspondiente con gp120 o gp41 recombinante soluble, en el contexto del sobrenadante de cultivo de linfocitos B y sobrenadantes transfectantes recombinantes.

Tabla 15

Prioridad de acierto de cultivo de linfocitos B	ID de muestra por cultivo de linfocitos B		Exploración de cultivo de linfocitos B				Exploración de transfectante con respecto a anticuerpos recombinantes						Exploración de transfectante con respecto a anticuerpos monoclonales recombinantes					
			Índice de neutralización		DO ELISA		Combinaciones H y L		ELISA cuantitativo de transfectante		Índice de neutralización		Combinaciones de H y L clonales		ELISA cuantitativo de transfectante		Índice de neutralización	
Rango	Placa	Pocillo	JRSCF	SF162	gp120	gp41	Familia de cadena pesada	Familia de cadena ligera	Conc de anti-gp-120 o anti-gp41 promedio* (µg/ml)	Concentración de IgG total promedio (µg/ml)	JRSCF	SF162	Clon de cadena pesada	Clon de cadena ligera	Conc de anti-gp-120 o anti-gp41 promedio* (µg/ml)	Concentración de IgG total promedio (µg/ml)	JRSCF	SF162
1	1456	P20	42,77	1,63	3,78	Neg	1456 P20 γ1	1456 P20 κ1	4,03	4,62	0,80	9,57	1456 P20 γ1 018	1456 P20 κ1 021	0,07	8,01	0,66	0,66
1	1456	P20	42,77	1,63	3,78	Neg	1456 P20 γ1	1456 P20 κ1	4,03	4,62	0,80	9,57	1456 P20 γ1 018	1456 P20 κ1 024	0,01	6,81	0,88	0,78
1	1456	P20	42,77	1,63	3,78	Neg	1456 P20 γ1	1456 P20 κ1	4,03	4,62	0,80	9,57	1456 P20 γ1 023	1456 P20 κ1 021	9,45	6,99	0,89	10,72
1	1456	P20	42,77	1,63	3,78	Neg	1456 P20 γ1	1456 P20 κ1	4,03	4,62	0,80	9,57	1456 P20 γ1 023	1456 P20 κ1 024	12,49	7,76	1,39	20,83
2	1477	B12	18,52	0,81	Neg	2,02	1477 B12 γ3	1477 B12 λ2	0,04	3,23	13,25	1,20	1477 B12 γ3 017	1477 B12 λ2 022	0,00	5,98	0,72	0,83
2	1477	B12	18,52	0,81	Neg	2,02	1477 B12 γ3	1477 B12 λ2	0,04	3,23	13,25	1,20	1477 B12 γ3 023	1477 B12 λ2 022	10,96	6,02	0,90	0,94
4	1443	C16	179,12	1,11	Neg	Neg	1443 C16 γ1	1443 C16 λ2	N/A	0,63	2,96	0,86	1443 C16 γ1 018	1443 C16 λ2 019	0,00	0,25	1,00	1,07
4	1443	C16	179,12	1,11	Neg	Neg	1443 C16 γ1	1443 C16 λ2	N/A	1,63	2,96	0,86	1443 C16 γ1 021	1443 C16 λ2 019	0,00	1,51	0,97	1,20
4	1443	C16	179,12	1,11	Neg	Neg	1443 C16 γ3	1443 C16 λ2	N/A	3,50	115,86	0,88	1443 C16 γ3 023	1443 C16 λ2 019	0,00	6,38	55,62	0,67
5	1496	C9	166,09	1,34	Neg	Neg	1496 C09 γ3	1496 C09 λ2	N/A	5,61	111,45	0,58	1496 C09 γ3 017	**1496 C09 λ2 017**	0,00	8,60	282,47	1,10
5	1496	C9	166,09	1,34	Neg	Neg	1496 C09 γ3	1496 C09 λ3	N/A	5,73	115,76	0,63	1496 C09 γ3 017	**1496 C09 λ3 024**	0,00	12,31	227,65	0,94
5	1496	C9	166,09	1,34	Neg	Neg	1496 C09 γ3	1496 C09 λ5	N/A	4,22	86,86	0,67	1496 C09 γ3 017	1496 C09 λ5 023	0,00	0,00	1,21	0,86
5	1496	C9	166,09	1,34	Neg	Neg	1496 C09 γ3	1496 C09 λ7	N/A	0,92	261,00	1,14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1495 C14 γ1	1495 C14 λ1	160	2,66	1,67	56,48	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1495 C14 γ1	1495 C14 λ3	2,20	3,34	1,67	84,87	1495 C14 γ1 017	1495 C14 λ3 017	0,00	0,00	0,89	0,97
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1495 C14 γ1	1495 C14 λ3	2,20	3,34	0,80	84,87	1495 C14 γ1 017	1495 C14 λ3 018	0,20	1,43	0,91	7,97
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1495 C14 γ1	1495 C14 λ3	2,20	3,34	0,80	84,87	1495 C14 γ1 017	1495 C14 λ3 022	0,22	1,65	0,89	9,90
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1495 C14 γ1	1495 C14 λ3	2,20	3,34	0,80	84,87	1495 C14 γ1 020	1495 C14 λ3 017	0,00	0,00	0,86	0,81
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1495 C14 γ1	1495 C14 λ3	2,20	3,34	0,80	84,87	1495 C14 γ1 020	1495 C14 λ3 018	12,61	3,76	1,26	95,15
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1495 C14 γ1	1495 C14 λ3	2,20	3,34	0,80	84,87	1495 C14 γ1 020	1495 C14 λ3 022	13,03	3,95	0,91	105,92
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1495 C14	1495 C14	2,20	3,34	0,80	84,87	1495 C14	1495 C14	0,00	0,00	1,07	0,79

ES 2 848 555 T3

(continuación)

6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	γ1 1495 C14 γ1	λ3 1495 C14 λ3	2,20	3,34	0,80	84,87	γ1 022 1495 C14 γ1 022	λ3 017 1495 C14 λ3 018	4,65	2,30	1,13	60,60
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1495 C14 γ1	1495 C14 λ3	2,20	3,34	0,80	84,87	1495 C14 γ1 022	1495 C14 λ3 022	5,91	3,18	0,89	39,65
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1503 C14 γ1	1503 C14 λ5	0,39	0,64	0,58	18,95	1503 C14 γ1 017	1503 C14 λ5 020	0,00	0,00	0,84	0,69
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1503 C14 γ1	1503 C14 λ5	0,39	0,64	0,58	18,95	1503 C14 γ1 020	1503 C14 λ5 020	0,00	0,00	0,95	0,65
6	1495	C14	1,42	87,13	3,76	Neg	1503 C14 γ1	1503 C14 λ5	0,39	0,64	0,58	18,95	1503 C14 γ1 022	1503 C14 λ5 020	0,00	0,00	0,99	0,87
10	1460	G14	1,62	1,57	3,49	Neg	1460 G14 γ1	1460 G14 κ1	13,41	16,25	0,61	17,07	1460 G14 γ1 023	1460 G14 κ1 017	17,37	12,44	1,64	39,43
10	1460	G14	1,62	1,57	3,49	Neg	1460 G14 γ1	1460 G14 κ2	12,49	14,61	0,81	15,37	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Gris más claro: par de H y L sugerido para anticuerpo monoclonal por pocillo de prioridad.
Gris medio con letras negras: indica clones derivados de la misma cadena H o L recombinante del pocillo de prioridad con secuencias idénticas.
En negrita: el clon de 1496 CO9 λ3 024 es probablemente un contaminante cruzado en el grupo de ADN recombinante ya que es idéntico es su secuencia a 1443 C16 λ2 019. La secuencia de 1495 C09 λ2 017 representa 21/22 clones en el grupo.
*Las concentraciones de anti-gp120 y anti-gp41 se extrapolaron a partir de las curvas patrón de b12 y 2F5 en ELISA cuantitativo, respectivamente.
N/A = no aplicable debido a que estos aciertos no eran gp-120 positivos y gp-41 positivos en cultivo de linfocitos B.
ND = no realizado

Los anticuerpos monoclonales purificados 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14) se ensayaron con respecto a neutralización de 6 cepas de VIH adicionales de los clados A (94UG103), B (92BR020, JR-CSF), C (93IN905, IAVI_C22) y CRF01_AE (92TH021) (Tabla 16). Los anticuerpos 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16) y 1495_C14 (PGC14) mostraron un perfil de neutralización similar al obtenido con el perfil de neutralización de sueros donantes. Los pseudovirus se preincubaron con cada anticuerpo monoclonal durante 1 hora o 18 horas antes de la infección de células diana. Los valores de CI_{50} derivados de preincubación de 1 o 18 horas fueron similares. Por lo tanto, en ensayos de neutralización adicionales que ensayan anticuerpos monoclonales purificados, se usó 1 hora de preincubación.

La Tabla 17A muestra los perfiles de neutralización para los 5 anticuerpos monoclonales 1496_C09 (PG9), 1443_C16 (PG16), 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14) en valores de CI_{50} en un panel extendido de 16 pseudovirus, junto con anticuerpos de neutralización para diferentes clados b12, 2G12, 2F5 y 4E10.

La Tabla 17B muestra la CI_{90} de dos anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) en el mismo panel diverso expandido de 16 pseudovirus de VIH de diferentes clados, junto con anticuerpos neutralizantes para diferentes clados b12, 2G12, 2F5 y 4E10. La Figura 4 muestra actividad de neutralización de anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) para otros 3 pseudovirus no incluidos en la Tabla 16.

Tabla 16. Ensayo de anticuerpo neutralizante: Sumario de CI50

		CI50 (µg/ml) Excepto donde se indique								
Incubación de virus/Ab		SF162	94UG103	92BR020	93IN905	IAVI_C22	92TH021	JRCSF	NL43	aMLV
1 hora	1443C16	>50	0,0211	>50	0,3302****	0,1143*	0,1362***	<0,0025	<0,0025**	>50
18 horas	1443C16	>50	0,0085	>50	0,2553*	0,1064***	0,0435	<0,0025	4,9874**	>50
1 hora	1456P20	0,1946	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,20	>50
18 horas	1456P20	0,0661	>50	>50	3,8384*	>50	>50	>50	0,05	>50
1 hora	1460G14	0,1789	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,17	>50
18 horas	1460G14	0,0573	>50	>50	3,1738*	>50	>50	>50	0,05	>50
1 hora	1495C14	0,0069	>50	1,1697	>50	>50	>50	>50	0,35	>50
18 horas	1495C14	<0,0025	>50	0,2442	0,1456*	13,3798	>50	>50	0,15	>50
1 hora	1496C09	>50	0,3336	>50	0,1444	24,8611	0,0612	<0,0025	0,2944*	>50
18 horas	1496C09	>50	0,0942	>50	0,0619	2,1073	0,0571	<0,0025	38,03	>50
1 hora	Z23 (1/dilu.)	13521	188	616	369	340	175	438	4793	<100
18 horas	Z23 (1/dilu.)	66074	262	1292	1396	614	336	1054	9472	<100

*nivel estable
**curva de inhibición plana – probablemente <0,0025 con nivel estable
***pendiente pequeña, muy larga
****nivel estable con pendiente pequeña, muy larga, hasta la curva

Tabla 17A. Perfil de neutralización en un panel diverso de virus: valores de CI_{50}

		PG9	PG16	PGC14	PGG14	PG20	b12	2G12	2F5	4E10
Clado A	94UG103	0,1731	0,0080	>50	>50	>50	3,54	>50	3,79	9,7
	92RW020	0,0637	0,0040****	28,5960	>50	>50	>50	0,56	3,37	3,38
	93UG077	>50	>50	>50	>50	>50	41,12	>50	4,45	11,15
Clado B	92BR020	>50	>50	0,6366	>50	>50	27,5	2,26	>50	41,44
	APV-13	>50	>50	>50	>50	>50	>25	23,9	2,8	3,8
	APV-17	26,4465	>50	>50	>50	>50	>25	>50	2	5,1
	APV-6	0,0869	0,08****	7,4062	>50	25,7798	>25	5,3	0,1	0,4
	JRCSF	<0,0025	<0,0025	>50	>50	>50	0,16	0,66	3,36	6
Clado C	93IN905	0,1400	0,1016***	>50	>50	>50	34,15	>50	>50	1,55
	IAVI-C18	0,0535	0,0067	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	IAVI-C22	24,8600	0,0687*	9,4999	>50	>50	3,6042	>50	>50	1,0229
	IAVI-C3	12,9103	14,8372	>50	>50	>50	5,0000	>50	>50	5,0000
Clado D	92UG024	10,9552	>50	>50	>50	>50	49,06	0,59	1,27	1,32
	92UG005	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	11,75	8,86
CRF01_AE	92TH021	0,1105	0,1273***	>50	>50	>50	9,99	>50	1,51	1,9
	CMU02	>50	>50	>50	>50	>50	4,25	>50	0,38	0,59
C Pos	NL43	N/A	<0,0025**	0,3727	0,1717	0,1880	0,06	0,75	2,41	4,95
C Neg	aMLV	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50

NA – no aplicable
CI_{50}: concentración inhibidora para inhibir el 50 % del virus

Tabla 17B. Perfil de neutralización en un panel diverso de virus: valores de CI_{90} para los mAb PG9 y PG16

		PG9	PG16	b12	2G12	2F5	4E10
Clado A	94UG103	3,3736	1,5915	47,29	>50	46,63	>50
	92RW020	6,5462	>50	>50	6,23	27,74	36,11
	93UG077	>50	>50	>50	>50	33,44	>50
Clado B	92BR020	>50	>50	>50	24,09	>50	>50
	APV-13	>50	>50	>50	N/A	N/A	N/A
	APV-17	>50	>50	>50	N/A	N/A	N/A
	APV-6	1,9591	44,2600	>50	N/A	N/A	N/A
	JRCSF	<0,0025	0,0130	1,17	5,38	25,31	44,07
Clado C	93IN905	1,8945	>50	>50	>50	>50	12.82
	IAVI-C18	0,8659	0,2074	>50	>50	N/A	>50
	IAVI-C22	>50	>50	29,6187	>50	>50	16,405
	IAVI-C3	>50	>50		>50	N/A	N/A
Clado D	92UG024	>50	>50	>50	7,57	34,44	23.71
	92UG005	>50	>50	>50	>50	>50	>50
CRF01_AE	92TH021	1,9871	23,4110	>50	>50	18,78	23,52
	CMU02	>50	>50	34,2	>50	12,25	13,4
C Pos	NL43	N/A	>50	0,28	15,75	19,32	29,56
C Neg	aMLV	>50	>50	>50	>50	>50	>50

NA – no aplicable
CI_{90}: concentración inhibidora para inhibir el 90 % del virus
***efecto de nivel estable

Ejemplo 5: especificidad de unión de anticuerpos monoclonales por gp120 de VIH mediante ensayo de ELISA

Los anticuerpos monoclonales anti-gp120 purificados, 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14), se confirmaron con respecto a reactividad de unión con gp120 en ensayos de ELISA. Cuando se valoraron en diluciones en serie, los tres anticuerpos mostraron perfiles de unión similares lo que sugería avidez relativa significativamente mayor que anti-gp120 (b12) de control. MAb b12 se dirige contra un epítopo que solapa con el sitio de unión a CD4. (Burton DR *et al*. 1994. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. Science 266: 1024-1027).

La Figura 5 muestra curvas de respuesta a dosis de 1456_P20 (PG20), 1460_G14 (PGG14) y 1495_C14 (PGC14) que se unen con gp120 recombinante en ELISA en comparación con anti-gp120 (b12) de control. Los datos muestran valores de DO promedios de pocillos de ELISA por triplicado obtenidos en la misma placa.

Los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) se ensayaron con respecto a unión con proteínas de envoltura recombinantes solubles derivadas de varias cepas de VIH en ensayo de ELISA. Se realizaron ensayos de ELISA como se describe en Pantophlet, R., *et al*. J Virol 77, 642-658 (2003). Para ELISA de unión a antígeno, se añadieron diluciones en serie de PG9 a pocillos recubiertos con antígeno y se exploró la unión con Ab F(ab')2 anti-inmunoglobulina G (IgG) humana conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce). Para ELISA de competición, se añadieron mAb competidores a pocillos de ELISA y se incubaron durante 15 min antes de añadir PG9 biotinilado 15 µg/ml a cada pocillo. Se detectó PG9 biotinilado usando estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Pierce) y se visualizó usando un sustrato de fosfato de p-nitrofenol (Sigma). Se usó VIH-HXB2 gp120 para ensayos de ELISA de competición.

La Figura 6 muestra los resultados de ensayos de unión de ELISA de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) para VIH-1 YU2 gp140, JR-CSFgp120, péptido de regiones externas próximas a membrana (MPER) de gp41 y polipéptido V3. Después se confirmó la especificidad de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) por gp120, pero se observó que la unión con glucoproteína de envoltura soluble era débil.

Ejemplo 6: reactividad de unión de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) para proteínas de la envoltura expresadas en superficie celular transfectada y competición por CD4 soluble (sCD4).

Se realizaron ensayos de unión de células de MAb como se describe en Pancera, M. y Wyatt, R. Virology 332, 145-156 (2005). Se añadieron cantidades de valoración de PGA y PG16 a células 293T transfectadas con VIH-1 Env, se incubaron durante 1 h a 4 ºC, se lavaron con tampón de FACS y se tiñeron con $F(ab')_2$ de cabra anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina. Para ensayos de competición, se añadieron anticuerpos competidores a las células 15 min antes de añadir PG9 o PG16 biotinilado 0,1 µg/ml. Para ensayos de inhibición de sCD4, se añadió sCD4 40 µg/ml a las células y se incubó durante 1 h a 4 ºC antes de añadir cantidades de valoración de anticuerpos. Se analizó la unión usando citometría de flujo, y las curvas de unión se generaron representando la intensidad de

fluorescencia media de unión a antígeno en función de la concentración de anticuerpo.

Se recubrieron placas de ELISA de noventa y seis pocillos durante una noche a 4 ºC con 50 µl de PBS que contenía 100 ng de gp1200 o gp140 por pocillo. Los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS que contenía Tween 20 0,025 % y se bloquearon con BSA al 3 % a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadieron diluciones en serie de PG9 a pocillos recubiertos de antígeno, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron 4x con PBS complementado con Tween 20 0,025 %. La unión se exploró con Ab F(ab')2 de cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) humana conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce) diluido 1:1000 en PBS que contenía BSA 1 % y Tween 20 0,025 %. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, se lavó cuatro veces y la placa se reveló añadiendo 50 µl de sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma) a 5 ml de tampón de tinción de fosfatasa alcalina (pH 9,8), según las instrucciones del fabricante. La densidad óptica a 405 nm se leyó en un lector de microplacas (Molecular Devices). Para ELISA de competición, se añadieron mAb competidores a pocillos de ELISA recubiertos con $gp120_{HxB2}$ o $gp140_{YU2}$ y se incubaron durante 15 min antes de añadir 15 µg/ml de PG9 biotinilado a cada pocillo. Se detectó PG9 biotinilado usando estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Pierce) y se visualizó usando sustrato de fosfato de p-nitrofenol (Sigma). Para ELISA de inhibición de sCD4, se añadió sCD4 5 µg/ml a pocillos recubiertos con antígeno y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente antes de añadir cantidades de valoración de PG9. Se usó un lector de placas FACSArray™ (BD Biosciences, San José, CA) para análisis citométrico de flujo y se usó software FlowJo™ para interpretación de datos.

Se transfectaron células 293 con VIH gp160 derivado de YU2. Se detectó la unión de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) en células transfectadas (Figura 7). La preincubación de células transfectadas con CD4 soluble (sCD4) inhibió parcialmente la unión del anticuerpo monoclonal para 1496_C09 (PG9), y para 1443_C16 (PG16) lo que sugiere que la unión del anticuerpo se efectúa por la presencia de sCD4. La unión se inhibe en al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 % o al menos 30 %. También se detectó la unión de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) con células 293 transfectadas con gp160 derivadas de las cepas JR-CSF y ADA (Figura 8). La unión de ambos anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) con células transfectadas con JR-CSF se bloqueó mediante sCD4. Los resultados confirman adicionalmente que las actividades de unión de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) están afectadas por la presencia de sCD4.

Ejemplo 7: Reactividad de unión de los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) and 1496_C09 (PG9) con pseudovirus

Se usó ensayo de captura de virus *in vitro* para ensayar si los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) se unen con pseudovirus competentes para entrada intactos. Se recubrió el fondo de una placa de 96 pocillos con anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) mediante Fc anti-humano. Se añadió pseudovirus JR-CSF y se capturó mediante el anticuerpo monoclonal 1443_C16 (PG16) o 1496_C09 (PG9) de una manera dependiente de dosis. Se añadieron células diana para iniciar la infección. La infección medida en ULR representó entonces la actividad de unión y captura de anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9). La Figura 9 la unión y captura de pseudovirus JR-CSF por los anticuerpos monoclonales tanto 1443_C16 (PG16) como 1496_C09 (PG9) de una manera dependiente de dosis, que es similar o mejor que otro anticuerpo neutralizante amplio y potente conocido 2G12.

Ejemplo 8: Los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) compiten de forma cruzada entre sí y con sCD4 en la unión con pseudovirus JR-CSF.

En una versión de competición del ensayo de captura de virus en la que se capturó pseudovirus JR-CSF por anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16), se midió la competición de la captura por los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16), 1496_C09 (PG9) y sCD4. La Figura 10B muestra que la unión del anticuerpo monoclonal 1443_C16 (PG16) con pseudovirus JR-CSF estaba bloqueada por él mismo, el anticuerpo monoclonal 1496_C09 (PG9) y sCD4 de una manera dependiente de dosis. De una manera correspondiente, la Figura 10B muestra que la unión del anticuerpo monoclonal 1496_C09 (PG9) con pseudovirus JR-CSF estaba bloqueada por él mismo, el anticuerpo monoclonal 1443_C16 (PG16) y sCD4 de una manera dependiente de dosis. Los resultados indicaron que los anticuerpos monoclonales 1443_C16 (PG16) y 1496_C09 (PG9) se unen con epítopos estrechamente relacionados en gp120 y su unión se ve afectada por la presencia de sCD4 supuestamente debido a cambios conformacionales inducidos en la envoltura del VIH-1 por sCD4.

Ejemplo 9: propiedades de unión a antígeno de PG9 y PG16.

Las propiedades de unión a antígeno de PG9 y PG16 se determinaron por ensayos de ELISA como se muestra en la Figura 11A-B. Se determinó la unión de PG9 y PG16 con g120 monomérica y construcciones de gp140 trimerizadas artificialmente (Fig. 11A). Unión de PG9 y PG16 con Env expresada en la superficie de células 293T como se determina por citometría de flujo (Fig. 11B). Se usó b12 como un control para ensayos de ELISA. El bNAb b12 y el anticuerpo no neutralizante b6 se incluyeron en los ensayos de unión a superficie celular para mostrar los porcentajes esperados de Env escindida y no escindida expresada en la superficie celular.

Ejemplo 10: unión de PG9 y PG16 con trímeros de VIH-1_{YU2} defectuosos en escisión

Se determinó la unión de PG9 y PG16 con trímeros de VIH-1_{YU2} defectuosos en escisión mediante citometría de flujo. PG9 y PG16 se unen con alta afinidad con trímeros de VIH-1_{YU2} defectuosos en escisión como se muestra en la Figura 12. Se generaron curvas de unión representando la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la unión a antígeno en función de la concentración de anticuerpo.

Ejemplo 11: mapeo de los epítopos de PG9 y PG16.

Se realizó mapeo de los epítopos de PG9 y PG16 mediante un ensayo de unión competitiva como se muestra en la Figura 13. PG9 y PG16 compitieron entre sí por la unión a Env en superficie celular y ninguno de los anticuerpos compitió con el anticuerpo de CD4bs b12 por la unión con Env. El anticuerpo competidor se indica en la parte superior de cada gráfico (Fig. 13A). El ligamiento de Env de superficie celular con sCD4 disminuyó la unión de PG9 y PG16. Se incluyó 2G12 para controlar con respecto a desprendimiento de gp120 inducido por CD4 (Fig. 13B). scD4 inhibió la unión de PG9 con $gp140_{JR\text{-}CSF}$ trimerizado artificialmente como se determina mediante ELISA. (Fig. 13C). PG9 compitió con 10/76b (anti-V2), F425/b4e8 (anti-V3) y X5 (CD4i) por la unión de gp120 en ensayos de ELISA de competición. (Fig. 13D). PG9 y PG16 no consiguieron unirse con variantes de VIH-$1_{JR\text{-}CSF}$ con bucle variable suprimido expresadas en la superficie de células 293T. Se incluyó 2G12 para controlar con respecto a expresión de Env en superficie celular. (Fig. 13E).

Ejemplo 12: ensayos de ELISA de competición usando PG9.

Cuando se realizaron ensayos de ELISA de competición usando PG9, PG9 competió con c108g (anti-V2) y compitió parcialmente con 17b (CD4i). No se observó competición con A32 (anti-C1/C2/C4/CD4i), C11 (C1), 2G12 (escudo de glucano), b6 (CD4bs), b3 (CD4bs) o 23b (C1/C5) por la unión con $gp120_{HxB2}$ como se muestra en la Figura 14.

Ejemplo 13: unión de PG9 y PG16 con VIH-$1_{JR\text{-}FL}$ E168K.

Se muestra en la Figura 15 la unión del anticuerpo con VIH-1JR-FLΔCT E168K Env expresada en la superficie de células 293T como se determina por citometría de flujo. Se usó una construcción con cola citoplasmática suprimida para aumentar la expresión de superficie celular. El bNAb b12 y el anticuerpo no neutralizante b6 se incluyeron en los ensayos de unión en superficie celular para mostrar los porcentajes esperados de Env escindida y no escindida expresada en la superficie celular. (Pancera M., *et al*. Virology 332: 145 (2005). Se generó VIH-1JR-FL E168K mediante mutagénesis dirigida. Se generaron curvas de unión representando el IFM de unión a antígeno en función de la concentración de anticuerpo.

Ejemplo 14: unión de PG9 con gp120 desglucosilada.

Se trató $gp120_{DU422}$ con endoglucosidasa H 40mU/µg (Endo H, New England Biolabs) en tampón de acetato sódico durante 24 h a 37 ºC. Se trató gp120 tratado con simulación en las mismas condiciones, pero la enzima se omitió de la reacción. Se determinó la unión de PG9 y b6 con gp120 tratada con EndoH y tratada de forma simulada mediante ELISA como se muestra en la Figura 16.

Ejemplo 15: actividad de neutralización contra VIH-1_{SF162} K160N

Se determinó la actividad de neutralización de PG9 y PG16 contra VIH-1_{SF162} y VIH-1_{SF162} K160N usando un ensayo indicador de luciferasa de replicación de un único ciclo de virus pseudotipificado. Se generó VIH-1_{SF162} K160N mediante mutagénesis dirigida como se muestra en la Figura 17.

Ejemplo 16: unión de PG9 y PG16 con trímeros mixtos

Se introdujeron sustituciones de alanina en las posiciones 160 y 299 en VIH-1_{YU2} Env para anular la unión de PG9 y PG16. También se introdujo una sustitución de alanina en la posición 295 en la misma construcción para anular la unión de 2G12. La co-transfección de células 293T con plásmidos WT y mutantes en una relación 1:2 dio como resultado la expresión de 29 % de homotrímeros mutantes, 44 % de heterotrímeros con dos subunidades mutantes, 23 % de heterotrímeros con una subunidad mutante y 4 % de homotrímeros de tipo silvestre. Estas proporciones se calcularon usando la fórmula descrita en Yang, X., Kurteva, S., Lee, S. y J. Sodroski, J Virol 79(6): 3500-3508 (Mar 2005), y supone que gp120 mutantes y de tipo silvestre se mezclan aleatoriamente para formar trímeros. La unión de mAb con trímeros de Env se determinó mediante citometría de flujo como se muestra en la Figura 18. Se incluyó b12 como control con respecto a la expresión en superficie celular de Env.

Ejemplo 17: actividad de neutralización de PG9 o PG16 en VIH con mutaciones de alanina dentro de gp120.

Las mutaciones de alanina dentro de gp120 de VIH reducen la actividad de neutralización de PG9 o PG16 como se muestra en la Tabla 21. En la tabla, la numeración de aminoácidos se basa en la secuencia de VIH-1_{HxB2}. Las cajas están codificadas por colores de la siguiente manera: blanco, el aminoácido es idéntico entre 0 y 49 % de todos los

aislados de VIH-1; gris claro, el aminoácido es idéntico entre 50 a 90 % de aislados; gris oscuro, el aminoácido es idéntico entre 90 a 100 % de los aislados. La identidad de aminoácidos se determinó basándose en un alineamiento de secuencias de aislados de VIH-1 enumerados en la base de datos de secuencia de VIH en hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html. C se refiere a dominios constantes y V se refiere a bucles variables. La actividad de neutralización se presenta como factor de aumento en el valor de CI_{50} en relación con JR-CSF WT y se calculó usando la ecuación (CI_{50} de mutante / CI_{50} de WT). Las cajas están codificadas por colores de la siguiente manera: blanco, sustituciones que tuvieron un efecto negativo en la actividad de neutralización; gris claro, aumento de CI_{50} de 4-9 veces; gris medio, aumento de CI_{50} 10-100 veces; gris oscuro, aumento de CI_{50} >100 veces. Se realizaron experimentos por triplicado y los valores representan un promedio de al menos tres experimentos independientes.

Tabla 18A

Clado	Virus	CI50 (µg/ml)[a]							CI50 (1/dilu.)[b]
		b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14	Suero de donante
A	MGRM-A-001	>50	>50	>50	15,08	>50	>50	>50	<100
	MGRM-A-002	>50	>50	>50	6,45	0,02	0,004	>50	804
	MGRM-A-003	>50	>50	7,37	5,94	0,65	2,65	>50	<100
	MGRM-A-004	>50	>50	7,49	3,14	0,02	0,04	>50	523
	MGRM-A-005	3,64	>50	5,70	4,09	0,28	0,09	>50	175
	MGRM-A-006	13,62	13,75	15,73	9,87	>50	>50	>50	131
	MGRM-A-007	>50	>50	16,33	1,82	0,37	5,91	>50	142
	MGRM-A-008	>50	>50	>50	7,59	>50	>50	>50	142
	MGRM-A-009	4,34	7,47	9,40	12,01	0,03	0,01	>50	941
	MGRM-A-010	>50	17,01	20,75	14,44	0,02	0,004	>50	1430
	MGRM-A-011	4,01	>50	>50	2,88	0,02	0,24	>50	404
	MGRM-A-012	>50	>50	2,36	4,27	11,18	20,72	>50	<100
	MGRM-A-013	7,04	>50	0,66	1,46	0,16	0,09	>50	350
	MGRM-A-014	>50	>50	1,43	1,74	0,62	20,33	>50	158
	94UG103	6,92	48,12	1,92	4,97	0,24	0,04	>50	350
	92RW020	>50	0,48	3,36	4,54	0,08	0,28	46	282
	93UG077	46,95	>50	3,30	10,60	>50	>50	>50	206
	94KE105	>50	7,22	>50	7,63	29,56	6,13	>50	<100
	93RW029	>50	>50	>50	15,52	1,19	3,83	42	256
	92RW009	>50	26,14	39,08	>50	0,03	0,11	>50	254
	92UG031	>50	>50	3,81	4,94	3,08	0,43	>50	259
	92RW026	>50	17,20	8,63	12,88	0,27	0,03	>50	361
	92UG037	>50	45,24	3,24	8,84	0,02	0,01	>50	1252
	92RW008	9,46	22,47	10,41	14,53	0,01	0,002	37	4067
	92RW021*	>50	>50	4,16	4,87	0,05	0,11	>50	316
	VLGCA1	>50	>50	3,90	4,58	0,07	0,18	>50	197
	92RW024	>50	>50	8,22	8,88	0,18	0,06	>50	241

Tabla 18B

Clado	Virus	CI50 (µg/ml)[a]							CI50 (1/dilu.)[b]
		b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14	Suero de donante
B	6535.3 (Agudo)	1,93	3,85	2,76	1,23	0,22	36,88	35	387
	QH0692.42 (Agudo)	0,73	4,39	5,42	12,67	>50	>50	>50	<100
	SC422661.8 (Agudo)	6,11	0,84	>50	6,35	0,79	1,13	>50	182
	PVO.4 (Agudo)	>50	0,80	>50	18,32	4,01	5,43	>50	171
	TRO.11 (Agudo)	>50	0,29	>50	1,39	5,43	0,22	>50	222
	CAAN.A2 (Agudo)	>50	>50	23,05	17,89	5,67	8,83	>50	<100
	TRJ0.58 (Agudo)	>50	>50	>50	11,94	0,43	1,16	>50	171
	THR0.18 (Agudo)	3,62	>50	>50	4,68	12,39	1,34	>50	<100
	92BR020	>50	4,84	>50	>50	>50	>50	4	<100
	APV_13	>50	9,24	3,81	7,33	>50	>50	>50	<100
	APV_17	>50	>50	4,61	10,53	14,59	24,78	>50	<100
	APV_6	>50	1,90	0,25	1,10	0,12	0,29	23	394
	93TH305	4,17	0,55	7,61	12,33	2,08	19,34	6	133
	VLGCB3	0,15	7,90	>50	5,76	0,02	0,40	21	244
	JRCSF	0,21	0,37	1,85	3,30	0,003	0,001	15	8425
	NL43	0,17	0,49	2,02	4,67	0,32	0,02	40	1488
	MGRM-Crónico-B-001	0,75	0,08	0,55	1,46	>50	>50	>50	<100
	MGRM-Crónico-B-002	0,86	>50	1,25	2,19	1,41	3,06	>50	220
	MGRM-Crónico-B-003	>50	0,06	1,00	3,50	50,00	0,19	>50	280
	MGRM-Crónico-B-004	0,26	8,65	2,41	3,70	0,11	0,01	>50	1316
	MGRM-Crónico-B-008	2,82	0,55	>50	16,70	6,66	0,73	>50	140
	MGRM-Crónico-B-010	>50	1,50	0,96	1,69	0,004	0,01	27	1640
	MGRM-Crónico-B-011	2,11	>50	0,81	1,07	>50	>50	>50	249
	MGRM-Crónico-B-012	>50	0,22	17,65	48,05	0,91	3,74	>50	304
	MGRM-Crónico-B-017	2,59	>50	>50	2,77	0,32	0,02	>50	644
	MGRM-Crónico-B-018	0,66	>50	10,80	23,19	0,16	0,70	>50	180
	MGRM-Crónico-B-020	6,16	0,20	0,78	2,45	>50	>50	>50	<100
	MGRM-Crónico-B-023	>50	0,16	0,10	27,92	0,04	0,13	>50	286
	MGRM-Crónico-B-024	>50	>50	>50	9,19	0,18	0,01	>50	884
	JRFL	0,02	1,45	3,54	18,91	>50	>50	>50	<100
	SF162	0,02	1,67	2,52	4,28	>50	>50	<0,0025	9777

Tabla 18C

Clado	Virus	CI50 (µg/ml)[a]							CI50 (1/dilu.)[b]
		b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14	Suero de donante
C	MGRM-C-001	>50	2,93	>50	5,66	>50	16,79	>50	175
	MGRM-C-002	>50	>50	44,68	18,19	>50	28,30	>50	<100
	MGRM-C-004	5,46	>50	>50	24,24	1,18	5,09	>50	183
	MGRM-C-005	2,66	>50	>50	16,41	2,98	2,55	>50	306
	MGRM-C-006	>50	>50	>50	4,94	0,23	2,62	>50	224
	MGRM-C-007	>50	>50	>50	5,84	0,09	0,05	>50	598
	MGRM-C-008	1,51	>50	>50	2,97	>50	>50	>50	160
	MGRM-C-009	>50	>50	>50	0,56	>50	>50	>50	<100
	MGRM-C-010	>50	>50	>50	10,96	12,45	>50	>50	<100
	MGRM-C-012	>50	>50	>50	0,44	0,24	0,48	>50	432
	MGRM-C-013	>50	>50	18,35	2,10	>50	>50	>50	105
	MGRM-C-014	>50	>50	>50	2,48	0,64	>50	>50	124
	MGRM-C-015	13,30	1,75	>50	2,52	0,50	0,26	>50	365
	MGRM-C-017	>50	>50	>50	1,47	1,52	1,80	>50	190
	MGRM-C-019	>50	>50	>50	3,49	0,01	0,002	12	6894
	MGRM-C-020	>50	18,58	>50	2,80	>50	>50	>50	<100
	MGRM-C-022	>50	>50	>50	5,71	0,19	0,25	>50	126
	MGRM-C-023	13,38	>50	>50	1,95	0,51	0,09	>50	220
	MGRM-C-024	>50	>50	>50	22,61	0,22	0,04	>50	494
	MGRM-C-025	>50	>50	>50	5,58	0,17	0,04	>50	434
	93IN905	21,38	>50	>50	1,26	0,03	0,25	19	647
	IAVIC_18	>50	>50	>50	>50	0,10	0,02	>50	577
	IAVI_C22	7,64	>50	>50	2,02	0,14	0,02	25	1002
	IAVI_C3	0,94	>50	>50	2,85	1,45	9,55	12	443
	98IN022	0,42	>50	>50	0,53	0,006	0,003	9	2708
	93MW959	>50	>50	>50	4,55	0,04	0,007	>50	976
	97ZA012	>50	>50	>50	4,70	1,27	2,55	>50	188
CRF08_BC	98CN006	>50	>50	>50	1,91	>50	>50	>50	397
CRF07_BC	98CN009	1,52	>50	>50	2,46	1,07	5,76	43	289

Tabla 18D

Clado	Virus	CI50 (µg/ml)[a]							CI50 (1/dilu.)[b]
		b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14	Suero de donante
D	MGRM-D-001	>50	>50	0,63	1,84	>50	>50	>50	<100
	MGRM-D-002	>50	>50	24,64	9,44	0,027	0,01	29	515
	MGRM-D-003	>50	>50	>50	2,49	0,02	0,01	>50	363
	MGRM-D-004	>50	>50	2,30	1,58	0,03	0,01	>50	616
	MGRM-D-005	>50	25,66	>50	35,16	0,59	19,66	>50	<100
	MGRM-D-008	>50	>50	>50	42,90	6,86	>50	>50	<100
	MGRM-D-011	7,75	1,50	>50	0,91	0,06	0,01	>50	298
	MGRM-D-012	0,13	>50	1,70	1,13	9,31	0,35	>50	<100
	MGRM-D-013	>50	>50	2,12	5,38	0,06	0,11	>50	<100
	MGRM-D-014	>50	>50	2,22	3,24	0,02	0,003	48	5127
	MGRM-D-016	1,12	>50	9,85	15,45	0,10	0,02	>50	364
	MGRM-D-018	1,39	0,12	4,05	3,90	0,02	0,004	>50	883
	MGRM-D-019	>50	>50	0,14	0,04	0,03	0,01	>50	497
	MGRM-D-020	>50	>50	>50	>50	2,03	16,27	>50	<100
	MGRM-D-021	5,23	22,98	>50	13,26	>50	>50	>50	<100
	MGRM-D-022	17,63	>50	8,45	16,92	>50	>50	>50	<100
	MGRM-D-024	5,92	>50	>50	3,60	0,03	0,02	>50	239
	MGRM-D-026	1,55	>50	4,37	2,95	17,51	>50	>50	<100
	MGRM-D-028	0,78	>50	>50	1,28	4,39	>50	>50	<100
	MGRM-D-029	>50	>50	>50	5,30	>50	>50	>50	<100
	92UG024	45,64	0,42	0,95	2,17	1,91	23,98	>50	112
	92UG005	>50	>50	8,61	7,46	>50	>50	>50	<100
	92UG046	0,07	>50	>50	12,15	0,64	1,42	>50	114
	92UG001	1,01	>50	12,98	13,58	41,79	>50	>50	<100
	94UG114	>50	13,92	>50	9,72	>50	>50	>50	<100

Tabla 18E

Clado	Virus	CI50 (µg/ml)[a]							CI50 (1/dilu.)[b]
		b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14	Suero de donante
CRF01_AE	MGRM-AE-001	25,95	>50	0,29	0,85	2,97	4,33	>50	<100
	MGRM-AE-002	17,10	>50	0,31	0,55	0,04	0,01	>50	653
	MGRM-AE-003	>50	>50	0,24	0,34	0,02	0,03	>50	211
	MGRM-AE-004	>50	>50	0,98	1,27	0,01	0,002	>50	1773
	MGRM-AE-005	0,63	>50	0,14	0,47	0,16	0,02	>50	233
	MGRM-AE-006	>50	>50	0,18	0,23	0,05	0,03	>50	151
	MGRM-AE-007	>50	>50	0,07	0,45	0,11	0,04	>50	176
	MGRM-AE-008	>50	>50	>50	0,94	10,58	3,25	>50	141
	92TH021	N/A	>50	N/A	1,17	0,09	0,10	>50	192
	CMU02	29,32	>50	0,60	0,72	7,69	43,63	>50	142
CRF_AG	MGRM-AG-001	11,87	0,69	0,75	1,12	8,83	0,03	>50	388
	MGRM-AG-002	0,89	0,54	0,54	0,80	0,04	0,03	>50	147
	MGRM-AG-003	>50	>50	0,14	0,64	9,71	>50	>50	<100
	MGRM-AG-005	>50	>50	>50	2,13	29,67	>50	>50	150
	MGRM-AG-006	>50	3,92	0,85	1,76	>50	>50	>50	<100
	MGRM-AG-008	>50	>50	0,54	1,48	0,02	0,002	45	1518
	MGRM-AG-009	>50	>50	24,80	31,39	>50	>50	>50	<100
	MGRM-AG-011	>50	>50	>50	1,36	0,01	0,002	>50	1427
	MGRM-AG-012	10,40	1,94	0,33	0,86	1,37	25,13	>50	<100
	MGRM-AG-013	>50	0,95	1,79	2,61	0,23	0,31	>50	<100
G	MGRM-G-001	>50	>50	4,1	2,04	0,16	0,15	>50	<100
	MGRM-G-004	>50	>50	>50	1,47	>50	>50	>50	<100
	MGRM-G-006	>50	>50	1,33	1,23	0,51	2,42	>50	116
	MGRM-G-009	>50	>50	7,21	1,34	4,90	>50	>50	<100
	MGRM-G-011	>50	>50	1,16	1,44	0,19	0,04	>50	150
	MGRM-G-013	>50	>50	0,59	1,15	>50	>50	>50	<100
	MGRM-G-014	>50	>50	9,65	13,67	6,32	6,98	>50	<100
	MGRM-G-015	>50	>50	0,43	1,07	1,51	5,33	>50	<100
	MGRM-G-016	>50	>50	16,82	1,02	0,40	11,35	>50	<100
	MGRM-G-017	>50	>50	0,60	1,14	0,03	0,02	>50	453
	MGRM-G-019	3,77	31,03	>50	6,53	0,67	1,21	>50	<100
	MGRM-G-024	2,38	>50	1,07	1,57	0,07	0,01	>50	236
	MGRM-G-025	>50	31,94	>50	1,70	>50	>50	>50	<100
	MGRM-G-027	>50	>50	0,28	1,19	0,01	0,01	>50	351
	MGRM-G-028	>50	28,25	2,24	6,32	0,13	3,09	>50	<100

Tabla 18F

Clado	Virus	CI50 (µg/ml)[a]							CI50 (1/dilu.)[b]
		b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14	Suero de donante
F	MGRM-F1-004	>50	>50	4,31	2,74	0,11	0,43	>50	104
	MGRM-F1-006	>50	>50	1,10	1,01	1,45	0,27	>50	<100
	MGRM-F1-008	>50	>50	1,61	2,75	>50	>50	>50	<100
	MGRM-F1-010	>50	N/A	14,56	3,69	0,03	0,01	>50	634
	MGRM-F1-012	>50	1,81	>50	0,37	0,01	0,003	>50	866
	MGRM-F1-013	>50	>50	4,57	N/A	0,56	N/A	6	142
	MGRM-F1-014	>50	>50	15,13	7,36	0,01	0,01	>50	437
	MGRM-F1-015	>50	>50	0,10	0,53	>50	>50	>50	<100
	MGRM-F1-016	>50	>50	21,47	7,61	0,58	1,12	>50	<100
	MGRM-F1-017	>50	>50	>50	4,92	>50	>50	>50	<100
	MGRM-F1-018	>50	>50	3,91	3,60	0,03	0,01	>50	432
	MGRM-F1-020	>50	>50	0,59	0,66	4,55	4,35	>50	<100
	MGRM-F1-021	>50	14,09	1,37	1,87	>50	>50	46	<100
	MGRM-F1-022	>50	>50	1,26	1,01	0,06	0,08	>50	246
	MGRM-F1-023	>50	9,23	1,78	0,44	>50	>50	>50	101
control neg.	aMLV	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	<100

[a]Los cuadrados blancos indican una CI50 de > 50 µg/ml, los cuadrados negros indican 50 µg/ml > CI50 > 10 µg/ml, cuadrados gris más claro indican 10 µg/ml > CI50 > 1 µg/ml, cuadrados gris medio indican 1 µg/ml > CI50 > 0,1 µg/ml, cuadrados gris más oscuros indican CI50 < 0,01 µg/ml. N.D., no realizado.

[b]Los cuadrados blancos indican una CI50 de < 1:100 de dilución, los cuadrados gris más oscuros indican 1:50 > CI50 > 1:150, los cuadros gris más claros indican 1:150>CI50>1:500, los cuadrados gris medio indican 1:500 >

CI50 > 1:1000, los cuadrados gris oscuro indican CI50 > 1:1000 de dilución.

Tabla 19A. Potencia de neutralización

		Mediana de CI_{90} (µg/ml) frente a virus neutralizados con una CI_{90} <50 µg/ml						
Clado[a]	N.º de virus	b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14
A	27	48,45	17,77	28,82	40,62	0,99	0,81	>50
B	31	2,30	4,65	25,85	32,38	0,11	0,01	9,45
C	27	28,41	28,67	>50	23,37	2,94	5,10	>50
D	25	12,68	8,76	9,02	23,45	0,34	0,44	>50
CRF01_AE	10	12,68	>50	8,14	12,95	0,36	1,51	>50
CRF_AG	10	16,97	7,04	13,49	15,78	0,28	1,86	>50
G	15	23,62	>50	17,54	16,67	1,91	1,96	>50
F	15	>50	21,49	17,77	7,64	0,25	0,55	>50
total	162	20,30	13,27	17,54	23,37	0,36	1,16	9,45

Las cajas blancas indican una potencia media de >50 µg/ml, gris más oscuro entre 20 y 50 µg/ml, gris más claro entre 2 y 20 µg/ml, gris medio entre 0,2 y 2 µg/ml y gris oscuro <0,2 µg/ml.
*Los virus CRF_07BC y CRF_08BC no se incluyeron en el análisis de clados debido a que solamente hubo un virus ensayado de cada uno de estos clados.

Tabla 19B. Amplitud de neutralización

		N.º de virus neutralizados con una CI_{90} <50 µg/ml						
Clado[a]	N.º de	b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14
A	27	4	4	33	22	74	41	0
B	31	45	52	45	23	42	26	6
C	27	15	4	0	41	52	41	0
D	25	28	12	12	20	44	36	0
CRF01_AE	10	11	0	67	70	60	60	0
CRF_AG	10	10	30	70	60	40	40	0
G	15	13	0	53	53	47	27	0
F	15	0	7	47	43	47	29	0
total	162	19	15	33	36	51	35	4
		N.º de virus neutralizados con una CI_{90} <1,0 µg/ml						
Clado[a]	N.º de virus	b12	2G12	2F5	4E10	PG9	PG16	PGC14
A	27	0	0	0	0	36	27	0
B	31	10	6	0	0	13	19	3
C	27	0	0	0	0	15	15	0
D	25	0	4	0	0	32	20	0
CRF01_AE	10	0	0	0	0	40	30	0
CRF_AG	10	0	0	0	0	30	10	0
G	15	0	0	0	0	13	7	0
F	15	0	0	0	0	33	21	0
total	162	2	2	0	0	25	18	<1

Las cajas blancas indican que no se neutralizó ningún virus, el gris más oscuro indica que se neutralizaron del 1 al 30 % de los virus, el gris más claro indica que se neutralizaron del 30 al 60 % de los virus, el gris medio indica que se neutralizaron del 60 al 90 % de los virus y el gris oscuro indica que se neutralizaron del 90 al 100 % de los virus.
*Los virus CRF_07BC y CRF_08BC no se incluyeron en el análisis de clados debido a que solamente hubo un virus ensayado de cada uno de estos clados.

Tabla 20. Actividad de neutralización de PG9 y PG16 contra pseudovirus JR-CSF que contienen mutaciones puntuales de alanina.

Mutación[a,b]	Dominio de gp120[c]	Factor de aumento de CI_{50} en relación con el tipo silvestre[d]		Mutación[a,b]	Dominio de gp120[c]	Factor de aumento de CI_{50} en relación con el tipo silvestre[d]	
		PG9	PG16			PG9	PG16
W112A	C1	1	1	P299A	V3 (base)	200	1400
V120A	C1	2	1	N301A	V3 (base)	9	3
K121A	C1 (V1/V2 (tallo)	1	1	N302A	V3 (tallo)	1	1
L122A	C1 (V1/V2 (tallo)	2	1	R304A	V3 (tallo)	2	3
L125A	C1 (V1/V2 (tallo)	1	1	K305A	V3 (tallo)	50	2800
V127A	C1 (V1/V2 (tallo)	30	57	S306A	V3 (punta)	1	1
N134A	V1	5	23	I307A	V3 (punta)	10	3000
N156A	C1 (V1/V2 (tallo)	280	1500	H308A	V3 (punta)	3	1
S158A	C1 (V1/V2 (tallo)	>2000	>2000	I309A	V3 (punta)	9	150
F159A	C1 (V1/V2 (tallo)	>2000	>2500	P313A	V3 (punta)	1	1
N160K	V2	>2000	>2500	R315A	V3 (punta)	1	1
T162A	V2	>2000	>2500	F317A	V3 (punta)	3	1400
I165A	V2	1	1	Y318A	V3 (punta)	2	1000
R166A	V2	2	1	T319A	V3 (punta)	1	1
D167A	V2	5	30	T320A	V3 (punta)	2	1
K168A	V2	1	3	E322A	V3 (tallo)	2	3
K171A	V2	1	1	D325A	V3 (tallo)	1	1
E172A	V2	1	1	H330A	V3 (base)	1	1
Y173A	V2	1400	1000	N332A	V3 (base)	1	1
F176A	V2	>5000	>7000	Q337A	C3	1	1
Y177A	V2	1	5	N339A	C3	1	1
L179A	V2	1	3	K343A	C3	1	1
D180A	V2	1	4	R350A	C3	1	1
V181A	V2	200	250	N355A	C3	9	3
V182A	V2	1	3	S365A	C3	2	3
I184A	V2	1	1	N386A	C3	1	1
D185A	V2	1	1	T388A	C3	1	1
N188A	V2	3	3	N392A	V4	7	25
T190A	V2	2	4	W395A	V4	1	1
N197K	C2 (V1/V2 (tallo)	1	1	R419A	C4	3	3
T198A	C2 (V1/V2 (tallo)	2	1	I420A	C4	9	11
S199A	C2 (V1/V2 (tallo)	2	1	K421A	C4	1	1
T202A	C2 (V1/V2 (tallo)	1	1	Q422A	C4	9	5
F210A	C2	3	1	I423A	C4	40	14
I213A	C2	1	1	I424A	C4	10	9
N241A	C2	4	3	I439A	C4	2	3
N262A	C2	1	1	T450A	C4	1	1
N276A	C2	1	1	L452A	C4	1	1
N295A	C2	2	1	P470A	V5	1	1
T297A	V3 (base)	1	1				

[a]El número de aminoácido se basa en la secuencia de VIH-1_{HxB2}

[b]Las cajas blancas indican que el aminoácido es idéntico entre el 0 y el 49 % de todos los aislados de VIH, las cajas gris claro indican que el aminoácido es idéntico entre el 50-90 % de todos los aislados de VIH y las cajas gris oscuro indican que el aminoácido es idéntico entre el 90-100 % de todos los aislados de VIH. La identidad de aminoácidos se determinó basándose en un alineamiento de secuencias de aislados de VIH-1 enumerados en la base de datos de secuencias de VIH en http://hiv-gov/content/hiv-db/mainpage.html.

[c]C se refiere a dominios constantes y V se refiere a bucles variables.

[d]La actividad de neutralización se presenta como factor de aumento en el valor de CI50 en relación con JR-CSF WT y se calculó usando la ecuación (CI50 de mutante / CI50 de WT). Blanco: sustituciones que tuvieron un efecto

insignificante en la actividad de neutralización, gris más claro: aumento de CI50 de 4-9 veces, gris oscuro: aumento de CI50 de 10-100 veces, gris más oscuro: aumento de CI50 >100 veces.
Se realizaron experimentos por triplicado y los valores representan un promedio de al menos tres experimentos independientes.

Tabla 21. Mutaciones de alanina que reducen la actividad de neutralización de PG9 y PG16.

Mutación[a,b]	dominio de gp120[c]	Factor de aumento de CI_{50} en relación con el tipo silvestre[d]	
		PG9	PG16
V127A	C1 (V1/V2 tallo)	30	57
N134A	V1	5	23
N156A	C1 (V1/V2 tallo)	280	1500
S158A	C1 (V1/V2 tallo)	>2000	>2000
F159A	C1 (V1/V2 tallo)	>2000	>2500
N160K	V2	>2000	>2500
T162A	V2	>2000	>2500
D167A	V2	5	30
Y173A	V2	1400	1000
F176A	V2	>5000	>7000
V181A	V2	200	250
P299A	V3 (base)	200	1400
K305A	V3 (tallo)	50	2800
I307A	V3 (punta)	10	3000
I309A	V3 (punta)	9	150
F317A	V3 (punta)	3	1400
Y318A	V3 (punta)	2	1000
N392A	V4	7	23
I420A	C4	9	11
I423A	C4	40	14
I424A	C4	10	9

[a]La numeración de aminoácidos se basa en la secuencia de VIH-1_{HxB2}.
[b]Las cajas se codifican por colores de la siguiente manera: blanco, el aminoácido es idéntico entre el 0 y el 49 % de todos los aislados de VIH-1; gris claro, el aminoácido es idéntico entre el 50 y el 90 % de aislados; gris oscuro, el aminoácido es idéntico entre el 90 y el 100 % de aislados. La identidad de aminoácidos se determinó basándose en un alineamiento de secuencias de aislados de VIH-1 enumerados en la base de datos de secuencias de VIH en http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html.
[c]C se refiere a dominios constantes y V se refiere a bucles variables.
[d]La actividad de neutralización se presenta como factor de aumento en el valor de CI_{50} en relación con JR-CSF WT y se calculó usando la ecuación (CI_{50} de mutante / CI_{50} de WT). Las cajas están codificadas por colores de la siguiente manera: blanco, sustituciones que tuvieron un efecto negativo en la actividad de neutralización; gris claro, aumento de CI_{50} de 4 - 9 veces; gris medio, aumento de CI_{50} de 10 – 100 veces; gris oscuro, aumento de CI_{50} > 100 veces. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores representan un promedio de al menos tres experimentos independientes.

Ejemplo 18: identificación de clones hermanos de 14443 C16 (PG16)

Se identificaron clones hermanos de 1443 C16 exploraron la transfección clonal de genes de región variable rescatados con respecto a neutralización de JR-CSR. Por lo tanto, los anticuerpos que se identificaron como clones hermanos de 14443 C16 (PG16) tienen los perfiles de neutralización de VIH similares al 1443 C16 (PG16) monoclonal humano. Además, las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos de los anticuerpos clones hermanos son al menos 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 % o cualquier punto de porcentaje intermedio, idénticas a las de 1443 C16 (PG16).

Tabla 22

mAb hermanos de 1443 C16	Clon de cadena gamma	Clon de cadena ligera	Concentración de anticuerpo (µg/ml)	Índice de neutralización de JRCSF
1456 A12	1456_A12_G3_01_002	1456_A12_L2_01_023	0,006	0,90
		1456_A12_L2_01_036	0,012	0,82
		1456_A12_L2_01_040	0,016	2,79
	1456_A12_G3_01_004	1456_A12_L2_01_023	<0,005	1,00
		1456_A12_L2_01_036	<0,005	1,02
		1456_A12_L2_01_040	0,005	**6,95**
1469 M23	**1469_M23_G3_01_005**	**1469_M23_L2_01_001**	**2,624**	**215,74**
	1469_M23_G3_01_006		0,000	**10,05**
1480 I08	1480_I08_G3_01_012	1480_I08_L2_01_005	<0,005	**10,34**
	1480_I08_G3_01_016		**10**	**223,14**
	1480_I08_G3_01_021		<0,005	2,98
	1480_I08_G3_01_032		<0,005	**3,83**
	1480_I08_G3_01_037		34	1,36
	1480_I08_G3_01_055		<0,005	1,16
1489 I13	1489_I13_G3_01_003	1489_I13_L2_01_007	0,0000	2,02
	1489_I13_G3_01_004		0,0009	**22,86**
	1489_I13_G3_01_007		**1,455**	**139,35**
1503 H05	1503_H05_G1_01_001	1503_H05_L2_01_021	0,013	0,96
	1503_H05_G1_01_006		0,000	**3,75**
	1503_H05_G3_01_005		**1,108**	**91,41**
	1503_H05_G3_01_007		**0,567**	**155,54**

Obsérvese que la región constante de los clones de cadena pesada de 1456_A12 usados en la transfección contiene un error generado durante el proceso de clonación que no conduce a producción de IgG de longitud completa.

Ejemplo 19: clones hermanos de anticuerpos de 1443 C16 (PG16) y el anticuerpo 1443 C16 (PG16) muestran especificidad de neutralización similar

Los anticuerpos 1456 A12, 1503 H05, 1489 I13 y 1469 M23 se ensayaron con respecto a actividad de neutralización contra varios pseudovirus que contienen mutaciones definidas que mapean el epítopo de reactividad de 1443 C16 (PG16) en gp120 en un ensayo de TZM-bl convencional (Tabla 23). Como 1443 C16 (PG16), que no se une con o neutraliza JR-FL de tipo silvestre, sino que, en su lugar, neutraliza JR-FL con la mutación E168K, todos los clones hermanos de 1443 C16 (PG16) neutralizan JR-FL(E168K) con bajos valores de CI50. De forma similar, todos los clones hermanos de 1443 C16 (PG16) no neutralizan los mutantes Y318A y mutantes I309A de JR-CSF, donde parte del epítopo de unión potencial se mapea en la punta de V3.

Tabla 23. Especificidad de neutralización de clones hermanos de 1443 C16 (PG16) como se muestra con mutaciones específicas en gp120.

mAB	CI50 (µg/ml)					
	JR-CSF	JR-CSF(Y318A)	JR-CSF(I309A)	JR-FL(E168K)	ADA	92RW020
1503 H05	0,001	>1,0	>1,0	0,002	0,003	0,020
1456 A12	0,001	>1,0	>1,0	0,003	0,005	0,050
1469 M23	0,002	>1,0	>1,0	0,005	0,005	0,050
1489113	0,002	>1,0	>1,0	0,005	0,008	0,030
1443 C16	0,001	>1,0	>1,0	0,006	0,004	0,090
1496 C09	0,006	0,001	0,001	0,020	0,200	0,100

Ejemplo 20: clones hermanos de 1443 C16 (PG16) muestran amplitud y potencia de neutralización similar a 1443 C16 (PG16) para virus del Clado B y Clado C

Los anticuerpos 1456 A12, 1503 H05, 1489 I13 y 1469 M23 muestran actividad de neutralización contra un panel de pseudovirus de clado B y clado C con amplitud similar a 1443 C16 (PG16) en un ensayo de TZMI-bl convencional (Tabla 24). La potencia de neutralización de cada clon hermano para cada pseudovirus es comparable a la de 1443 C16 (PG16). Cuando se determina el valor de CI50, el valor para el clon hermano está dentro de un intervalo de 0,5 log del de 1443 C16 (PG16).

Tabla 24. Amplitud y potencia de neutralización de clones hermanos de 1443 C16 (PG16).

Virus		CI50 (µg/ml)				
		1443 C16	1456 A12	1469 M23	1503 H05	1489 I13
Clado B	CAAN	6,37	10,61	17,72	13,46	24,87
	REJ04541	<0,01	<0,01	0,39	0,22	0,34
	THRO.18	2,19	2,08	7,01	4,12	7,41
	PVO.4	12,3	10,42	21,25	11,01	20,57
	TR0.11	3,61	3,05	7,52	4,30	10,94
	AC10	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Clado C	DU156	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	DU422	0,59	0,36	0,97	0,71	1,87
	Du172	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	ZM214	>25	>25	>25	>25	>25
	ZM233	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	CAP45	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	ZM249	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Control	MuLV	>25	>25	>25	>25	>25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Theraclone Sciences, Inc.
Chan-Hui, Po-Ying
Frey, Steven
Olsen, ole
Mitcham, Jennifer
Moyle, Matthew
Phogat, Sanjay K.
Burton, Dennis R.
Walker, Laura M.
Poignard, Pascal R.G.
Koff, wayne
Simek-Lemos, Melissa

<120> Anticuerpos neutralizantes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

<130> 37418-507001WO

<140> PCT/US2010/027695
<141> 17-03-2010

<150> 61/165,829
<151> 01-04-2009

<150> 61/161,010
<151> 17-03-2009

<150> 61/224,739
<151> 10-07-2009

<150> 61/285,664
<151> 11-12-2009

<160> 142

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ser Ser Leu Thr Asp Arg Ser His Arg Ile Phe
1 5 10

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Lys Ser Leu Thr Ser Thr Arg Arg Arg Val Phe
1 5 10

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ser Phe Ser Thr Pro Arg Thr Phe
1 5

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ala Trp Glu Thr Thr Thr Thr Thr Phe Val Phe Phe
1 5 10

<210> 6
<211> 28
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr Asp Phe
1 5 10 15

Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val
20 25

<210> 7

<211> 28
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Asn Gly Tyr Asn Tyr Tyr Asp Phe
1 5 10 15

Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val
20 25

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Asp Arg Arg Val Val Pro Met Ala Thr Asp Asn Trp Leu Asp Pro
1 5 10 15

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Asp Arg Arg Ala Val Pro Ile Ala Thr Asp Asn Trp Leu Asp Pro
1 5 10 15

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Gly Ala Val Gly Ala Asp Ser Gly Ser Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 11
<211> 1461
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gcaactctgt taagagttgt gaagtgtcag 60
gaacaactgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagccgg gggggtccct gagactctcc 120
tgtttagcgt ctggattcac gtttcacaaa tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggcactcatc tcagatgacg gaatgaggaa atatcattca 240
gactccatgt ggggccgagt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac tctttatctg 300
caattcagca gcctgaaagt cgaagacacg gctatgttct tctgtgcgag agaggctggt 360
gggccaatct ggcatgacga cgtcaaatat tacgatttta atgacggcta ctacaactac 420
cactacatgg acgtctgggg caaggggacc acggtcaccg tctcgagcgc ctccaccaag 480
ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 540
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 600
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 660
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 720
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 780
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 840

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 900
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 960
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1020
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1080
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1140
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1200
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1260
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1320
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1380
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1440
tccctgtctc cgggtaaatg a 1461

<210> 12
<211> 467
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met
    50                  55                  60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
            100                 105                 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
        115                 120                 125
```

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

```
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385                 390                 395                 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                405                 410                 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            420                 425                 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        435                 440                 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    450                 455                 460

Pro Gly Lys
465
```

<210> 13
<211> 708
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

```
atggcctggg ctctgctatt cctcaccctc ttcactcagg gcacagggtc ctggggccag       60
tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggtctcctg gacagacgat caccatctcc       120
tgcaatggaa ccagcagtga cgttggtgga tttgactctg tctcctggta ccaacaatcc       180
ccagggaaag cccccaaagt catggttttt gatgtcagtc atcggccctc aggtatctct       240
aatcgcttct ctggctccaa gtccggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggctccac       300
attgaggacg agggcgatta tttctgctct tcactgacag acagaagcca tcgcatattc       360
ggcggcggga ccaaggtgac cgttctaggt cagcccaagg ctgcccctc ggtcactctg       420
ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt       480
gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg       540
ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac       600
ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacaaaagct acagctgcca ggtcacgcat       660
gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag                    708
```

<210> 14
<211> 216
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

Thr Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
            20                  25                  30

Asp Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
        35                  40                  45

Met Val Phe Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asn Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65                  70                  75                  80

His Ile Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Leu Thr Asp Arg
                85                  90                  95

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

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
        115                 120                 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145                 150                 155                 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
            180                 185                 190

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
    210                 215
```

<210> 15
<211> 1422
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

```
atggactgga tttggaggtt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt ccagtcccag
```

```
gtccgcctgg tacagtctgg gcctgaggtg aagaagcctg ggtcctcggt gacggtctcc      120
tgccaggctt ctggaggcac cttcagcagt tatgctttca cctgggtgcg ccaggccccc      180
ggacaaggtc ttgagtggtt gggcatggtc accccaatct ttggtgaggc caagtactca      240
caaagattcg agggcagagt caccatcacc gcggacgaat ccacgagcac aacctccata      300
gaattgagag gcctgacatc cgaagacacg gccatttatt actgtgcgcg agatcggcgc      360
gcggttccaa ttgccacgga caactggtta gacccctggg gccaggggac cctggtcacc      420
gtctcgagcg cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc      480
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg      540
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta      600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc      660
acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga      720
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc      780
ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc      840
cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag      900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag      960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg     1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa     1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc      1140
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc     1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg     1260
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag     1320
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac     1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga                        1422
```

<210> 16
<211> 454
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

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

Ser Val Thr Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
```

```
Ala Phe Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
        35                  40                  45

Gly Met Val Thr Pro Ile Phe Gly Glu Ala Lys Tyr Ser Gln Arg Phe
    50                  55                  60

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

Ile Glu Leu Arg Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Arg Arg Ala Val Pro Ile Ala Thr Asp Asn Trp Leu Asp
            100                 105                 110

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

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

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

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 17
<211> 711
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

agatgtgaca tccagttgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt tggcgacaga 120

gtctccatca cttgccgggc gagtcagacc attaacaact acttaaattg gtatcaacag 180

acacccggga aagcccctaa actcctgatc tatggtgcct ccaatttgca aaatggggtc 240

ccatcaaggt tcagcggcag tggctctggg acagacttca ctctcaccat cagcagtctg 300

caacctgagg attttgcaac ttactactgt caacagagtt tcagtactcc gaggaccttc 360

ggccaaggga cacgactgga tattaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 420

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta g 711

<210> 18
<211> 214
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19
<211> 1422
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

atggactgga tttggaggtt cctcttggtg gtggcagcag ctacaggtgt ccagtcccag 60
gtcctgctgg tgcagtctgg gactgaggtg aagaagcctg ggtcctcggt gaaggtctcc 120
tgtcaggctt ctggaggcgc cttcagtagt tatgctttca gctgggtgcg acaggcccct 180
ggacaggggc ttgaatggat gggcatgatc acccctgtct ttggtgagac taaatatgca 240
ccgaggttcc agggcagact cacacttacc gcggaagaat ccttgagcac cacctacatg 300
gaattgagaa gcctgacatc tgatgacacg gccttttatt attgtacgag agatcggcgc 360
gtagttccaa tggccacaga caactggtta gacccctggg gccaggggac gctggtcacc 420
gtctcgagcg cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 480
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 660
acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 720
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 780
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 840
cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1140
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc 1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag 1320

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1422

<210> 20

<211> 453
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Ala Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Met Ile Thr Pro Val Phe Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Arg Phe
    50                  55                  60

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

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

Thr Arg Asp Arg Arg Val Val Pro Met Ala Thr Asp Asn Trp Leu Asp
            100                 105                 110

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

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

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

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 21
<211> 711
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tcctctggct ccgaggtgcc 60
acatgtgaca tccagttgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacagg 120
gtcaccgtca cttgccgggc gagtcagacc atacacacct atttaaattg gtatcagcaa 180
attccaggaa aagcccctaa gctcctgatc tatggtgcct ccaccttgca aagtggggtc 240
ccgtcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat caacagtctc 300
caacctgagg actttgcaac ttactactgt caacagagtt acagtacccc aaggaccttc 360
ggccaaggga cacgactgga tattaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta g 711

<210> 22
<211> 214
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23
<211> 1416
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

atggactgga tttggaggat cctcctcttg gtggcagcag ctacaggcac cctcgccgac 60
ggccacctgg ttcagtctgg ggttgaggtg aagaagactg gggctacagt caaaatctcc 120
tgcaaggttt ctggatacag cttcatcgac tactaccttc attgggtgca acgggcccct 180
ggaaaaggcc ttgagtgggt gggacttatt gatcctgaaa atggtgaggc tcgatatgca 240
gagaagttcc agggcagagt caccataatc gcggacacgt ctatagatac aggctacatg 300
gaaatgagga gcctgaaatc tgaggacacg gccgtgtatt tctgtgcagc aggtgccgtg 360
ggggctgatt ccgggagctg gttcgacccc tggggccagg gaactctggt caccgtctcg 420
agcgcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 960

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1080

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 1140

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1260

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1416

<210> 24
<211> 452
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

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

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

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

Gly Leu Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ala Arg Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Ala Gly Ala Val Gly Ala Asp Ser Gly Ser Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 25
<211> 705
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

```
atggcctgga tccctctctt cctcggcgtc cttgcttact gcacagattc cgtagtctcc       60
tatgaactga ctcagccacc ctcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc cagcatcacc      120
tgttctggat ctaaattggg ggataaatat gtttcctggt atcaactgag gccaggccag      180
tcccccatac tggtcatgta tgaaaatgac aggcggccct ccgggatccc tgagcgattc      240
tccggttcca attctggcga cactgccact ctgaccatca gcgggaccca ggctttggat      300
gaggctgact tctactgtca ggcgtgggag accaccacca ccacttttgt tttcttcggc      360
ggagggaccc agctgaccgt tctaggtcag cccaaggctg ccccctcggt cactctgttc      420
ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tggtgtgtct cataagtgac      480
ttctacccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga      540
gtggagacca ccacaccctc caaacaaagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg      600
agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcccac aaaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa      660
gggagcaccg tggagaagac agtggccccct acagaatgtt catag                     705
```

<210> 26
<211> 215
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

```
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1               5                  10                  15

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

Ser Trp Tyr Gln Leu Arg Pro Gly Gln Ser Pro Ile Leu Val Met Tyr
        35                  40                  45

Glu Asn Asp Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

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

Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Gln Ala Trp Glu Thr Thr Thr Thr Thr
                85                  90                  95

Phe Val Phe Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
            100                 105                 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
        115                 120                 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
                165                 170                 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys
            180                 185                 190

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

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
    210                 215
```

<210> 27
<211> 1458
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctttct taagaggtgt ccagtgtcag 60

cgattagtgg agtctggggg aggcgtggtc cagcctgggt cgtccctgag actctcctgt 120

gcagcgtccg gattcgactt cagtagacaa ggcatgcact gggtccgcca ggctccaggc 180

caggggctgg agtgggtggc atttattaaa tatgatggaa gtgagaaata tcatgctgac 240

tccgtatggg gccgactcag catctccaga gacaattcca aggatacgct ttatctccaa 300

atgaatagcc tgagagtcga ggacacggct acatattttt gtgtgagaga ggctggtggg 360

cccgactacc gtaatgggta caactattac gatttctatg atggttatta taactaccac 420

tatatggacg tctggggcaa agggaccacg gtcaccgtct cgagcgcctc caccaagggc 480

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 540

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 600

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 660

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 720

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 780

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 840

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 900

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 960

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1020

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1080

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1140

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1200

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1260

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1320

tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1380

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1440

ctgtctccgg gtaaatga 1458

<210> 28
<211> 466
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Gln Gly
20 25 30

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala

```
        35                  40                  45

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

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

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

Arg Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Asn Gly Tyr Asn Tyr Tyr Asp
            100                 105                 110

Phe Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys
        115                 120                 125

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145                 150                 155                 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
                165                 170                 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
            180                 185                 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
        195                 200                 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
    210                 215                 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225                 230                 235                 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285
```

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 29
<211> 708
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

atggcctggg ctctgctttt cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggtctcctg gacagtcgat caccatctcc 120

tgcaatggaa ccagcaatga tgttggtggc tatgaatctg tctcctggta ccaacaacat 180

cccggcaaag cccccaaagt cgtgatttat gatgtcagta aacggccctc aggggtttct 240

aatcgcttct ctggctccaa gtccggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggctccag 300

gctgaggacg agggtgacta ttactgcaag tctctgacaa gcacgagacg tcgggttttc 360

ggcactggga ccaagctgac cgttctaggt cagcccaagg ctgcccccтc ggtcactctg 420

ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 480

gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540

ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 600

ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacaaaagct acagctgcca ggtcacgcat 660

gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag 708

<210> 30
<211> 216
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Glu Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Arg Arg Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 31
<211> 137
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met
50 55 60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
100 105 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 32
<211> 110
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

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

Thr Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
            20                  25                  30

Asp Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
        35                  40                  45

Met Val Phe Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asn Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65                  70                  75                  80

His Ile Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Leu Thr Asp Arg
                85                  90                  95

Ser His Arg Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 33
<211> 124
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

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

Ser Val Thr Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Phe Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
        35                  40                  45

Gly Met Val Thr Pro Ile Phe Gly Glu Ala Lys Tyr Ser Gln Arg Phe
    50                  55                  60

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

Ile Glu Leu Arg Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Arg Arg Ala Val Pro Ile Ala Thr Asp Asn Trp Leu Asp
```

100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys
100 105

<210> 35
<211> 124
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Met Ile Thr Pro Val Phe Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Arg Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Asp Arg Arg Val Val Pro Met Ala Thr Asp Asn Trp Leu Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 122
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

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

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

Gly Leu Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ala Arg Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Ala Gly Ala Val Gly Ala Asp Ser Gly Ser Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

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

<210> 38
<211> 109
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

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

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

Ser Trp Tyr Gln Leu Arg Pro Gly Gln Ser Pro Ile Leu Val Met Tyr
35 40 45

Glu Asn Asp Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Gln Ala Trp Glu Thr Thr Thr Thr Thr
85 90 95

Phe Val Phe Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 39
<211> 136
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Gln Gly
            20                  25                  30

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

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

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

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

Arg Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Asn Gly Tyr Asn Tyr Tyr Asp
            100                 105                 110

Phe Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys
        115                 120                 125

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 40
<211> 110
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr
            20                  25                  30

Glu Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
        35                  40                  45
```

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Arg Arg Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Ser Ser Leu Thr Asp Arg Ser His Arg Ile
1 5 10

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Gln Ala Trp Glu Thr Thr Thr Thr Thr Phe Val Phe
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Lys Ser Leu Thr Ser Thr Arg Arg Arg Val
1 5 10

<210> 46
<211> 1461
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gcaactctgt taagagttgt gaagtgtcac 60
gaacaactgg tggaggccgg gggaggcgtg gtccagccgg gggggtccct gagactctcc 120
tgtttagcgt ctggattcac gtttcacaaa tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggcactcatc tcagatgacg gaatgaggaa atatcattca 240
gactccatgt ggggccgagt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac tctttatctg 300
caattcagca gcctgagagt cgaagacacg gctatgttct tctgtgcgag agaggccggt 360
gggccaatct ggcatgacga cgtcaaatat tacgatttta atgacggcta ctacaactat 420
cactacatgg acgtctgggg caaggggacc aaggtcaccg tctcctcagc gtcgaccaag 480
ggcccatcgg tcttccctct ggcaccatca tccaagtcga cctctggggg cacagcggcc 540
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 600
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 660
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 720
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 780
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 840
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccccctga ggtcacatgc 900
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 960
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1020
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1080
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1140
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1200
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1260
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1320
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1380
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1440
tccctgtctc cgggtaaatg a 1461

<210> 47
<211> 467
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

```
His Glu Gln Leu Val Glu Ala Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

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

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

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met
    50                  55                  60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
            100                 105                 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
        115                 120                 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145                 150                 155                 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
                165                 170                 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
            180                 185                 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
    210                 215                 220
```

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 48
<211> 137

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

His Glu Gln Leu Val Glu Ala Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met
50 55 60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
100 105 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Lys Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 49
<211> 707
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

atggcctggg cttgctattc ctcaccctct tcactcaggg cacagggtcc tggggccagt 60

ctgccctgac tcagcctgcc tccgtgtctg ggtctcctgg acagacgatc accatctcct 120

gcaatggaac cagccgtgac gttggtggat ttgactctgt ctcctggtat caacaatccc 180

cagggaaagc ccccaaagtc atggtttttg atgtcagtca tcggccctca ggtatgtcta 240

atcgcttctc tggctccaag tccggcaaca cggcctccct gaccatttct gggctccaca 300

ttgaggacga gggcgattat ttctgctctt cattgacaga cagaagccat cgcatattcg 360

gcggcgggac caagctgacc gttctaggtc agcccaaggc tgcccctcg gtcactctgt 420

tcccgccctc ctctgaggag cttcaagcca acaaggccac actggtgtgt ctcataagtg 480

acttctaccc gggagccgtg acagtggcct ggaaggcaga tagcagcccc gtcaaggcgg 540

gagtggagac caccacaccc tccaaacaaa gcaacaacaa gtacgcggcc agcagctacc 600

tgagcctgac gcctgagcag tggaagtccc acaaaagcta cagctgccag gtcacgcatg 660

aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttcatag 707

<210> 50
<211> 216
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

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

Thr Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Arg Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asp Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
35 40 45

Met Val Phe Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly Met Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

His Ile Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Leu Thr Asp Arg
85 90 95

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

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 51
<211> 110
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

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

Thr Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Arg Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asp Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
35 40 45

Met Val Phe Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly Met Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

His Ile Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Leu Thr Asp Arg
85 90 95

Ser His Arg Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 52
<211> 1460
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

atggagtttg gctgagctgg gttttcctcg caactctgtt aagagttgtg aagtgtcagg 60

aaaaactggt ggagtctggg ggaggcgtgg tccagccggg ggggtccctg agactctcct 120

gtttagcgtc tggattcacc tttcacaaat atggcatgca ctgggtccgc caggctccag 180

gcaagggcct ggagtgggtg gcactcatct cagatgacgg aatgaggaaa tatcattcag 240

--

actccatgtg gggccgagtc accatctcca gagacaattc caagaacact ttatatctgc 300
aattcagcag cctgaaagtc gaagacacgg ctatgttctt ctgtgcgaga gaggctggtg 360
ggccaatctg gcatgacgac gtcaaatatt acgattttaa tgacggctac tacaattacc 420
actacatgga cgtctggggc aaggggacca ttgtcaccgt ctcctcagcg tcgaccaagg 480
gcccatcggt cttccctctg gcaccatcat ccaagtcgac ctctgggggc acagcggccc 540
tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg 600
ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga ctctactccc 660
tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg 720
tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagcccaaa tcttgtgaca 780
aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg tcagtcttcc 840
tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg 900
tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg 960
tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg 1020
tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca 1080
aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc 1140
agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc 1200
aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg 1260
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg 1320
gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg 1380
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct 1440
ccctgtctcc gggtaaatga 1460

<210> 53
<211> 467
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met

50 55 60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
100 105 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Lys Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

```
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305                 310                 315                 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                325                 330                 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            340                 345                 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        355                 360                 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    370                 375                 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385                 390                 395                 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                405                 410                 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            420                 425                 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        435                 440                 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    450                 455                 460

Pro Gly Lys
465
```

<210> 54
<211> 137
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 54

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met
50 55 60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
100 105 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Lys Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 55
<211> 707
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 55

atggcctggg cttgctattc ctcaccctct tcactcaggg cacagggtcc tggggccagt 60
ctgccctgac tcagcctgcc tccgtgtctg ggtctcctgg acagacgatc accatctcct 120
gcaatggaac cagaagtgac gttggtggat ttgactctgt ctcctggtac caacaatccc 180
cagggaaagc ccccaaagtc atggtttttg atgtcagtca tcggccctca ggtatctcta 240
atcgcttctc tggctccaag tccggcaaca cggcctccct gaccatctct gggctccaca 300
ttgaggacga gggcgattat ttctgctctt cactgacaga cagaagccat cgcatattcg 360
gcggcgggac caaggtgacc gttctaggtc agcccaaggc tgcccctcg gtcactctgt 420
tcccgccctc ctctgaggag cttcaagcca acaaggccac actggtgtgt ctcataagtg 480
acttctaccc gggagccgtg acagtggcct ggaaggcaga tagcagcccc gtcaaggcgg 540
gagtggagac caccacaccc tccaaacaaa gcaacaacaa gtacgcggcc agcagctacc 600
tgagcctgac gcctgagcag tggaagtccc acaaaagcta cagctgccag gtcacgcatg 660
aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttcatag 707

<210> 56
<211> 216
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 56

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asp Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
35 40 45

Met Val Phe Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

His Ile Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Leu Thr Asp Arg
85 90 95

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

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 57
<211> 110
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 57

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asp Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
35 40 45

Met Val Phe Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

His Ile Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Leu Thr Asp Arg
85 90 95

Ser His Arg Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 58
<211> 1461
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 58

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gcaactctgt taagagttgt gaagtgtcag 60
gaacaactgt tggagtctgg gggaggcgtg gtccagccgg gggggtccct gagactctcc 120
tgtttagcgt ctggattcac gtttcacaaa tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggcactcatc tcagatgacg gaatgaggaa atatcattca 240
aactccatgt ggggccgagt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac tctttatctg 300
caattcagca gcctgaaagt cgaagacacg gctatgttct tctgtgcgag agaggctggt 360
gggccaatct ggcatgacga cgtcaaatat tacgatttta atgacggcta ctacaactac 420
cactacatgg acgtctgggg caaggggacc acggtcaccg tctcctcagc gtcgaccaag 480
ggcccatcgg tcttccctct ggcaccatca tccaagtcga cctctggggg cacagcggcc 540
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 600
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 660
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 720
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 780
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 840
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 900

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 960

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1020

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1080

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1140

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1200

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1260

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1320

ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1380

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1440

tccctgtctc cgggtaaatg a 1461

<210> 59
<211> 467
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 59

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asn Ser Met
50 55 60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
100 105 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

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

```
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145                 150                 155                 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
                165                 170                 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
            180                 185                 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
    210                 215                 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230                 235                 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
                245                 250                 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            260                 265                 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        275                 280                 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    290                 295                 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305                 310                 315                 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                325                 330                 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            340                 345                 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        355                 360                 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    370                 375                 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385                 390                 395                 400
```

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 60
<211> 137
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 60

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asn Ser Met
50 55 60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
100 105 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 61
<211> 708
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 61

atggcctggg ctctgctatt cctcaccctc ttcactcagg gcacagggtc ccggggccag 60
tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggtctcctg gacagacgat caccatctcc 120
tgcaatggaa ccagcagtga cgttggtgga tttgactctg tctcctggta tcaacaatcc 180
ccagggaaag cccccaaagt catggttttt gatgtcagtc atcggccctc aggtatctct 240
aatcgcttct ctggctccaa gtccggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggctccac 300
attgaggacg agggcgatta tttctgctct tcactgacag acagaagcca tcgcatattc 360
ggcggcggga ccaaggtgac cgttctaggt cagcccaagg ctgcccctc ggtcactctg 420
ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 480
gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540
ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 600
ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacaaaagct acagctgcca ggtcacgcat 660
gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag 708

<210> 62

<400> 62 000

<210> 63

<400> 63 000

<210> 64
<211> 1460
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 64

atggagtttg gctgagctgg gttttcctcg caactctgtt aagagttgtg aagtgtcagg 60
aacaactggt ggagtctggg ggaggcgtgg tccagccggg ggggtccctg agactctcct 120
gtttagcgtc tggattcacg tttcacaaat atggcatgca ctgggtccgc caggctccag 180
gcaagggcct ggagtgggtg gcactcatct cagatgacgg aatgaggaaa tatcattcag 240
actccatgtg gggccgagtc accatctcca gagacaattc caagaacact ctttatctgc 300
aattcagcag cctgaaagtc gaagacacgg ctatgttctt ctgtgcgaga gaggctggtg 360
ggccaatctg gcatgacgac gtcaaatatt acgattttaa tgacggctac tacaactacc 420

actacatgga cgtctggggc aaggggacca cggtcaccgt ctcctcagcg tcgaccaagg 480

gcccatcggt cttccctctg gcaccatcat ccaagtcgac ctctgggggc acagcggccc 540

tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg 600

ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga ctctactccc 660

tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg 720

tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagcccaaa tcttgtgaca 780

aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg tcagtcttcc 840

tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg 900

tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg 960

tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg 1020

tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca 1080

aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc 1140

agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc 1200

aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg 1260

agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg 1320

gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg 1380

tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct 1440

ccctgtctcc gggtaaatga 1460

<210> 65
<211> 467
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met
50 55 60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
100 105 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 66

<400> 66 000

<210> 67
<211> 708
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 67

atggcctggg ctctgctatt cgtcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctggggccag 60

tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggtctcctg gacagacgat caccatctcc 120

tgcaatggaa ccagcagtga cgttggtgga tttgactctg tctcctggta tcaacaatcc 180

ccagggaaag cccccaaagt catggttttt gatgtcagtc atcggccctc aggtatctct 240

aatcgcttct ctggctccaa gtccggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggctccac 300

attgaggacg agggcgatta tttctgctct tcactgacag acagaagcca tcgcatattc 360

ggcggcggga ccaaggtgac cgttctaggt cagcccaagg ctgcccccctc ggtcactctg 420

ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 480

gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540

ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 600

ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacaaaagct acagctgcca ggtcacgcat 660

gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag 708

<210> 68
<211> 33
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 68
tctggattca cgtttcacaa atatggcatg cac 33

<210> 69
<211> 33
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 69
tctggattca cctttcacaa atatggcatg cac 33

<210> 70
<211> 33
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 70
tctggattca cctttcacaa atatggcatg cac 33

<210> 71
<211> 33
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> en donde n es c o g, o en donde n codifica un aminoácido que tiene propiedades similares a un aminoácido codificado por c o g.

<400> 71
tctggattca cntttcacaa atatggcatg cac 33

<210> 72
<211> 48
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 72
ctcatctcag atgacggaat gaggaaatat cattcagact ccatgtgg 48

<210> 73
<211> 48
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 73
ctcatctcag atgacggaat gaggaaatat cattcaaact ccatgtgg 48

<210> 74
<211> 48

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> en donde n es a o g, o en donde n codifica un aminoácido que tiene propiedades similares a un aminoácido codificado por una a o g.

<400> 74
ctcatctcag atgacggaat gaggaaatat cattcanact ccatgtgg 48

<210> 75
<211> 84
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 75

gaggctggtg ggccaatctg gcatgacgac gtcaaatatt acgattttaa tgacggctac 60

tacaactacc actacatgga cgtc 84

<210> 76
<211> 84
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> en donde n is t, c, o g, o en donde n codifica un aminoácido que tiene propiedades similares a un aminoácido codificado por t, c, o g.

<400> 76

gaggcnggtg ggccaatctg gcatgacgac gtcaaatatt acgattttaa tgacggctac 60

tacaactatc actacatgga cgtc 84

<210> 77
<211> 84
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 77

gaggccggtg ggccaatctg gcatgacgac gtcaaatatt acgattttaa tgacggctac 60

tacaactatc actacatgga cgtc 84

<210> 78
<211> 84
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

gaggcgggtg ggccaatctg gcatgacgac gtcaaatatt acgattttaa tgacggctac 60

tacaactatc actacatgga cgtc 84

<210> 79

<400> 79
000

<210> 80
<211> 42
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 80
aatggaacca gcagtgacgt tggtggattt gactctgtct cc 42

<210> 81
<211> 42
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> en donde n es c o a, o en donde n codifica un aminoácido que tiene propiedades similares a un aminoácido codificado por c o a.

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> en donde n es c o a, o en donde n codifica un aminoácido que tiene propiedades similares a un aminoácido codificado por c o a.

<400> 81
aatggaacca gnngtgacgt tggtggattt gactctgtct cc 42

<210> 82
<211> 42
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 82
aatggaacca gaagtgacgt tggtggattt gactctgtct cc 42

<210> 83
<211> 42
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 83
aatggaacca gccgtgacgt tggtggattt gactctgtct cc 42

<210> 84
<211> 24
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 84
gatgtcagtc atcggccctc aggt 24

<210> 85
<211> 30
<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 85
tcttcactga cagacagaag ccatcgcata 30

<210> 86
<211> 30
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 86
tcttcattga cagacagaag ccatcgcata 30

<210> 87
<211> 30
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> en donde n es c o t, o en donde n codifica un aminoácido que tiene propiedades similares a un aminoácido codificado por c o t.

<400> 87
tcttcantga cagacagaag ccatcgcata 30

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 88

Ser Gly Phe Thr Phe His Lys Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 89
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 89

Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met Trp
1 5 10 15

<210> 90

<400> 90 000

<210> 91

<400> 91 000

<210> 92
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 92

Asn Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Phe Asp Ser Val Ser
1 5 10

<210> 93
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 93

Asn Gly Thr Ser Arg Asp Val Gly Gly Phe Asp Ser Val Ser
1 5 10

<210> 94
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> en donde X es S o R, o en donde X codifica un aminoácido que tiene propiedades similares a S o R.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> en donde X es S o R, o en donde x codifica un aminoácido que tiene propiedades similares a S o R.

<400> 94

Asn Gly Thr Xaa Xaa Asp Val Gly Gly Phe Asp Ser Val Ser
1 5 10

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 95

Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly
1 5

<210> 96
<211> 110
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 96

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

Thr Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Phe
            20                  25                  30

Asp Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val
        35                  40                  45

Met Val Phe Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asn Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65                  70                  75                  80

His Ile Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Leu Thr Asp Arg
                85                  90                  95

Ser His Arg Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 97
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 97

```
Asn Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asp Ser Val Ser
1               5                   10
```

<210> 98
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 98

```
Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asn Ser Met Trp
1               5                   10                  15
```

<210> 99
<211> 411
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 99

caggaacaac tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc cgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtttag cgtctggatt cacgtttcac aaatatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcactc atctcagatg acggaatgag gaaatatcat 180
tcagactcca tgtggggccg agtcaccatc tccagagaca attccaagaa cactctttat 240
ctgcaattca gcagcctgaa agtcgaagac acggctatgt tcttctgtgc gagagaggct 300
ggtgggccaa tctggcatga cgacgtcaaa tattacgatt ttaatgacgg ctactacaac 360
taccactaca tggacgtctg gggcaagggg accacggtca ccgtctcgag c 411

<210> 100
<211> 330
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 100

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagac gatcaccatc 60
tcctgcaatg gaaccagcag tgacgttggt ggatttgact ctgtctcctg gtaccaacaa 120
tccccaggga aagccccaa agtcatggtt tttgatgtca gtcatcggcc ctcaggtatc 180
tctaatcgct tctctggctc caagtccggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
cacattgagg acgagggcga ttatttctgc tcttcactga cagacagaag ccatcgcata 300
ttcggcggcg ggaccaaggt gaccgttcta 330

<210> 101
<211> 372
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 101

caggtccgcc tggtacagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgacggtc 60
tcctgccagg cttctggagg caccttcagc agttatgctt tcacctgggt gcgccaggcc 120
cccggacaag gtcttgagtg gttgggcatg gtcaccccaa tctttggtga ggccaagtac 180
tcacaaagat tcgagggcag agtcaccatc accgcggacg aatccacgag cacaacctcc 240

atagaattga gaggcctgac atccgaagac acggccattt attactgtgc gcgagatcgg 300
cgcgcggttc caattgccac ggacaactgg ttagacccct ggggccaggg gaccctggtc 360
accgtctcga gc 372

<210> 102
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 102

Arg Ala Val Pro Ile Ala Thr Asp Asn Trp Leu Asp Pro
1 5 10

<210> 103
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 103

Arg Arg Ala Val Pro Ile Ala Thr Asp Asn Trp Leu Asp Pro
1 5 10

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 104

Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Phe Thr
1 5 10

<210> 105
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 105

Met Val Thr Pro Ile Phe Gly Glu Ala Lys Tyr Ser Gln Arg Phe Glu
1 5 10 15

<210> 106
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 106

gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggcga cagagtctcc 60

atcacttgcc gggcgagtca gaccattaac aactacttaa attggtatca acagacaccc 120

gggaaagccc ctaaactcct gatctatggt gcctccaatt tgcaaaatgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggctc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaggattttg caacttacta ctgtcaacag agtttcagta ctccgaggac cttcggccaa 300

gggacacgac tggatattaa a 321

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 107

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

<210> 108
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 108

Gly Ala Ser Asn Leu Gln Asn Gly
1 5

<210> 109
<211> 372
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 109

caggtcctgc tggtgcagtc tgggactgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgtcagg cttctggagg cgccttcagt agttatgctt tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacagg ggcttgaatg gatgggcatg atcacccctg tctttggtga gactaaatat 180

gcaccgaggt tccagggcag actcacactt accgcggaag aatccttgag caccacctac 240

atggaattga gaagcctgac atctgatgac acggcctttt attattgtac gagagatcgg 300

cgcgtagttc caatggccac agacaactgg ttagacccct ggggccaggg gacgctggtc 360

accgtctcga gc 372

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 110

Ser Gly Gly Ala Phe Ser Ser Tyr Ala Phe Ser
1 5 10

<210> 111
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 111

Met Ile Thr Pro Val Phe Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Arg Phe Gln
1 5 10 15

<210> 112
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 112

gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagggtcacc 60

gtcacttgcc gggcgagtca gaccatacac acctatttaa attggtatca gcaaattcca 120

ggaaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcctccacct tgcaaagtgg ggtcccgtca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacag tctccaacct 240

gaggactttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccaaggac cttcggccaa 300

gggacacgac tggatattaa a 321

<210> 113
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 113

Arg Ala Ser Gln Thr Ile His Thr Tyr Leu
1 5 10

<210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 114

Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly
1 5

<210> 115
<211> 366
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 115

gacggccacc tggttcagtc tggggttgag gtgaagaaga ctggggctac agtcaaaatc 60

tcctgcaagg tttctggata cagcttcatc gactactacc ttcattgggt gcaacgggcc 120

cctggaaaag gccttgagtg ggtgggactt attgatcctg aaaatggtga ggctcgatat 180

gcagagaagt tccagggcag agtcaccata atcgcggaca cgtctataga tacaggctac 240

atggaaatga ggagcctgaa atctgaggac acggccgtgt atttctgtgc agcaggtgcc 300

gtgggggctg attccgggag ctggttcgac ccctggggcc agggaactct ggtcaccgtc 360

tcgagc 366

<210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 116

Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 117
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 117

Leu Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ala Arg Tyr Ala Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

<210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 118

Ala Val Gly Ala Asp Ser Gly Ser Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 119
<211> 327
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 119

tcctatgaac tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60

acctgttctg gatctaaatt gggggataaa tatgtttcct ggtatcaact gaggccaggc 120

cagtccccca tactggtcat gtatgaaaat gacaggcggc cctccgggat ccctgagcga 180

ttctccggtt ccaattctgg cgacactgcc actctgacca tcagcgggac ccaggctttg 240

gatgaggctg acttctactg tcaggcgtgg gagaccacca ccaccacttt tgttttcttc 300

ggcggaggga cccagctgac cgttcta 327

<210> 120
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 120

Ser Gly Ser Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

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

<400> 121

Glu Asn Asp Arg Arg Pro Ser Gly
1 5

<210> 122
<211> 408
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 122

cagcgattag tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggtcgtccct gagactctcc 60

tgtgcagcgt ccggattcga cttcagtaga caaggcatgc actgggtccg ccaggctcca 120

ggccaggggc tggagtgggt ggcatttatt aaatatgatg gaagtgagaa atatcatgct 180

gactccgtat ggggccgact cagcatctcc agagacaatt ccaaggatac gctttatctc 240

caaatgaata gcctgagagt cgaggacacg gctacatatt tttgtgtgag agaggctggt 300

gggcccgact accgtaatgg gtacaactat tacgatttct atgatggtta ttataactac 360

cactatatgg acgtctgggg caaagggacc acggtcaccg tctcgagc 408

<210> 123
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 123

Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Gln Gly Met His
1 5 10

<210> 124
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 124

Phe Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr His Ala Asp Ser Val Trp
1 5 10 15

<210> 125
<211> 330
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 125

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcctgcaatg gaaccagcaa tgatgttggt ggctatgaat ctgtctcctg gtaccaacaa 120

catcccggca aagcccccaa agtcgtgatt tatgatgtca gtaaacggcc ctcaggggtt 180

tctaatcgct tctctggctc caagtccggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240

caggctgagg acgagggtga ctattactgc aagtctctga caagcacgag acgtcgggtt 300

ttcggcactg ggaccaagct gaccgttcta 330

<210> 126
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 126

```
Asn Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr Glu Ser Val Ser
1               5                   10
```

<210> 127
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 127

```
Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly
1               5
```

<210> 128
<211> 411
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 128

```
caggaaaaac tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc cgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtttag cgtctggatt cacctttcac aaatatggca tgcactgggt ccgccaggct     120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcactc atctcagatg acggaatgag gaaatatcat     180
tcagactcca tgtggggccg agtcaccatc tccagagaca attccaagaa cactctatat     240
ctgcaattca gcagcctgaa agtcgaagac acggctatgt tcttctgtgc gagagaggct     300
ggtgggccaa tctggcatga cgacgtcaaa tattacgatt ttaatgacgg ctactacaac     360
taccactaca tggacgtctg gggcaagggg accacggtca ccgtctcctc a              411
```

<210> 129
<211> 330
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 129

```
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagac gatcaccatc      60
tcctgcaatg gaaccagaag tgacgttggt ggatttgact ctgtctcctg gtaccaacaa     120
tccccaggga gagccccaa agtcatggtt tttgatgtca gtcatcggcc ctcaggtatc      180
tctaatcgct tctctggctc caagtccggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc     240
cacattgagg acgagggcga ttatttctgc tcttcactga cagacagaag ccatcgcata     300
ttcggcggcg ggaccaagct gaccgttcta                                      330
```

<210> 130

<211> 411
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 130

cacgaacaac tggtggaggc cgggggaggc gtggtccagc cgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtttag cgtctggatt cacgtttcac aaatatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcactc atctcagatg acggaatgag gaaatatcat 180
tcagactcca tgtggggccg agtcaccatc tccagagaca attccaagaa cactctttat 240
ctgcaattca gcagcctgag agtcgaagac acggctatgt tcttctgtgc gagagaggcc 300
ggtgggccaa tctggcatga cgacgtcaaa tattacgatt ttaatgacgg ctactacaac 360
tatcactaca tggacgtctg gggcaagggg accaaggtca ccgtctcctc a 411

<210> 131
<211> 330
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 131

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagac gatcaccatc 60
tcctgcaatg gaaccagccg tgacgttggt ggatttgact ctgtctcctg gtatcaacaa 120
tccccaggga aagcccccaa agtcatggtt tttgatgtca gtcatcggcc ctcaggtatg 180
tctaatcgct tctctggctc caagtccggc aacacggcct ccctgaccat ttctgggctc 240
cacattgagg acgagggcga ttatttctgc tcttcattga cagacagaag ccatcgcata 300
ttcggcggcg ggaccaagct gaccgttcta 330

<210> 132
<211> 411
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 132

caggaaaaac tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc cgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtttag cgtctggatt cacctttcac aaatatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcactc atctcagatg acggaatgag gaaatatcat 180
tcagactcca tgtggggccg agtcaccatc tccagagaca attccaagaa cactttatat 240
ctgcaattca gcagcctgaa agtcgaagac acggctatgt tcttctgtgc gagagaggct 300
ggtgggccaa tctggcatga cgacgtcaaa tattacgatt ttaatgacgg ctactacaat 360
taccactaca tggacgtctg gggcaagggg accattgtca ccgtctcctc a 411

<210> 133
<211> 330
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 133

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagac gatcaccatc 60

tcctgcaatg gaaccagaag tgacgttggt ggatttgact ctgtctcctg gtaccaacaa 120

tccccaggga aagcccccaa agtcatggtt tttgatgtca gtcatcggcc ctcaggtatc 180

tctaatcgct tctctggctc caagtccggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240

cacattgagg acgagggcga ttatttctgc tcttcactga cagacagaag ccatcgcata 300

ttcggcggcg ggaccaaggt gaccgttcta 330

<210> 134
<211> 411
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 134

caggaacaac tgttggagtc tgggggaggc gtggtccagc cgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtttag cgtctggatt cacgtttcac aaatatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcactc atctcagatg acggaatgag gaaatatcat 180

tcaaactcca tgtggggccg agtcaccatc tccagagaca attccaagaa cactctttat 240

ctgcaattca gcagcctgaa agtcgaagac acggctatgt tcttctgtgc gagagaggct 300

ggtgggccaa tctggcatga cgacgtcaaa tattacgatt ttaatgacgg ctactacaac 360

taccactaca tggacgtctg gggcaagggg accacggtca ccgtctcctc a 411

<210> 135
<211> 330
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 135

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagac gatcaccatc 60

tcctgcaatg gaaccagcag tgacgttggt ggatttgact ctgtctcctg gtatcaacaa 120

tccccaggga aagcccccaa agtcatggtt tttgatgtca gtcatcggcc ctcaggtatc 180

tctaatcgct tctctggctc caagtccggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240

cacattgagg acgagggcga ttatttctgc tcttcactga cagacagaag ccatcgcata 300

ttcggcggcg ggaccaaggt gaccgttcta 330

<210> 136
<211> 411
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 136

caggaacaac tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc cgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtttag cgtctggatt cacgtttcac aaatatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcactc atctcagatg acggaatgag gaaatatcat 180
tcagactcca tgtggggccg agtcaccatc tccagagaca attccaagaa cactctttat 240
ctgcaattca gcagcctgaa agtcgaagac acggctatgt tcttctgtgc gagagaggct 300
ggtgggccaa tctggcatga cgacgtcaaa tattacgatt ttaatgacgg ctactacaac 360
taccactaca tggacgtctg gggcaagggg accacggtca ccgtctcctc a 411

<210> 137
<211> 330
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 137

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagac gatcaccatc 60
tcctgcaatg gaaccagcag tgacgttggt ggatttgact ctgtctcctg gtatcaacaa 120
tccccaggga aagcccccaa agtcatggtt tttgatgtca gtcatcggcc ctcaggtatc 180
tctaatcgct tctctggctc caagtccggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
cacattgagg acgagggcga ttatttctgc tcttcactga cagacagaag ccatcgcata 300
ttcggcggcg ggaccaaggt gaccgttcta 330

<210> 138
<211> 1461
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 138

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gcaactctgt taagagttgt gaagtgtcag 60
gaaaaactgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagccgg gggggtccct gagactctcc 120
tgtttagcgt ctggattcac ctttcacaaa tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

```
ggcaagggcc tggagtgggt ggcactcatc tcagatgacg gaatgaggaa atatcattca      240
gactccatgt ggggccgagt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac tctatatctg      300
caattcagca gcctgaaagt cgaagacacg gctatgttct tctgtgcgag agaggctggt      360
gggccaatct ggcatgacga cgtcaaatat tacgatttta atgacggcta ctacaactac      420
cactacatgg acgtctgggg caaggggacc acggtcaccg tctcctcagc gtcgaccaag      480
ggcccatcgg tcttccctct ggcaccatca tccaagtcga cctctggggg cacagcggcc      540
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc      600
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      660
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac      720
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac      780
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc      840
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccccctga ggtcacatgc      900
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc      960
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt     1020
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc     1080
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg     1140
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac     1200
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg     1260
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac     1320
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac     1380
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc     1440
tccctgtctc cgggtaaatg a                                               1461
```

<210> 139
<211> 467
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 139

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

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

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

```
Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met
    50                  55                  60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
            100                 105                 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
        115                 120                 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145                 150                 155                 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
                165                 170                 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
            180                 185                 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
    210                 215                 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230                 235                 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
                245                 250                 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            260                 265                 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        275                 280                 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
```

290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 140
<211> 137
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 140

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

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

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

35 40 45

Ala Leu Ile Ser Asp Asp Gly Met Arg Lys Tyr His Ser Asp Ser Met
50 55 60

Trp Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Ile Trp His Asp Asp Val Lys Tyr Tyr
100 105 110

Asp Phe Asn Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 141
<211> 708
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 141

atggcctggg ctctgctatt cctcaccctc ttcactcagg gcacagggtc ctggggccag 60
tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggtctcctg gacagacgat caccatctcc 120
tgcaatggaa ccagaagtga cgttggtgga tttgactctg tctcctggta ccaacaatcc 180
ccagggagag cccccaaagt catggttttt gatgtcagtc atcggccctc aggtatctct 240
aatcgcttct ctggctccaa gtccggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggctccac 300
attgaggacg agggcgatta tttctgctct tcactgacag acagaagcca tcgcatattc 360
ggcggcggga ccaagctgac cgttctaggt cagcccaagg ctgcccctc ggtcactctg 420
ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 480
gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540
ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 600
ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacaaaagct acagctgcca ggtcacgcat 660
gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag 708

<210> 142
<211> 216
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 142

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

Thr Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Phe
            20                  25                  30

Asp Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val
        35                  40                  45

Met Val Phe Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asn Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65                  70                  75                  80

His Ile Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Leu Thr Asp Arg
                85                  90                  95

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

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
        115                 120                 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145                 150                 155                 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
            180                 185                 190

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
    210                 215
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-VIH, en el que dicho anticuerpo es PG16 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo neutraliza especies de VIH-1 que pertenecen a dos o más clados, y además en el que la potencia de neutralización de al menos un miembro de cada clado se determina por un valor de CI_{50} de menos de 0,2 µg/ml.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo neutraliza VIH-1 que pertenece a dos o más clados seleccionados de Clado A, Clado B, Clado C, Clado D y Clado AE.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el VIH-1 que pertenece a dos o más clados son virus no de Clado B.

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo (a) neutraliza al menos un miembro de cada clado con una potencia mayor que la de los bNAb b12, 2G12, 2F5 y 4E10 respectivamente, (b) no se une con proteínas gp120 o gp41 monoméricas del gen de env del VIH-1 o (c) se une con mayor afinidad con formas triméricas de la Env del VIH-1 expresada en una superficie celular que con la gp120 monomérica o gp140 trimerizada artificialmente.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el anticuerpo se une con alta afinidad con trímeros de gp160 de VIH-1 en una superficie celular.

7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el anticuerpo se une con un epítopo dentro del bucle variable de gp120, en el que el epítopo comprende las regiones conservadas de bucles V2 y V3 de gp120.

8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el epítopo comprende sitio de N-glucosilación en el resto Asn-160 dentro del bucle V2 de gp120.

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el anticuerpo no neutraliza el VIH-1 en ausencia de sitio de N-glucosilación en el resto Asn-160 dentro del bucle V2 de gp120.

10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el anticuerpo se une con un epítopo presentado por un pico trimérico de gp120 en una superficie celular, en el que el epítopo no se presenta cuando gp120 está trimerizado artificialmente.

11. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. El fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 11, que se selecciona del grupo que consiste en los Fab, Fab', F(ab')2, Fv, Fv monocatenario y diacuerpo.

13. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 11 o 12.

14. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, que se selecciona del grupo que consiste en ADNc, ARNnh y ARNm.

15. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.

16. Una célula que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 15.

17. Un clon de linfocitos B inmortalizado que expresa el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

18. Una composición farmacéutica que comprende al menos el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno como se indica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la molécula de ácido nucleico como se indica en la reivindicación 13 o 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, respectivamente.

19. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende además un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno específico para un segundo epítopo.

20. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se indica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la molécula de ácido nucleico como se indica en la reivindicación 13 o 14 para uso en el tratamiento o reducción del

efecto de una infección por VIH o una enfermedad relacionada con VIH o para profilaxis post-exposición.

21. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para el uso de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizado por que se administra un segundo agente terapéutico.

22. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para el uso de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizado por que dicho segundo agente terapéutico es un agente antivírico.

23. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la molécula de ácido nucleico como se indica en la reivindicación 13 o 14 para su uso en el tratamiento de un individuo contra una pluralidad de especies de VIH-1.

24. Un método para producir el anticuerpo como se indica en la reivindicación 1 que comprende: (i) cultivar un clon de linfocitos B inmortalizado que expresa un anticuerpo como se indica en la reivindicación 1 y (ii) aislar el anticuerpo.

FIG. 1A **Árbol de cadena pesada**

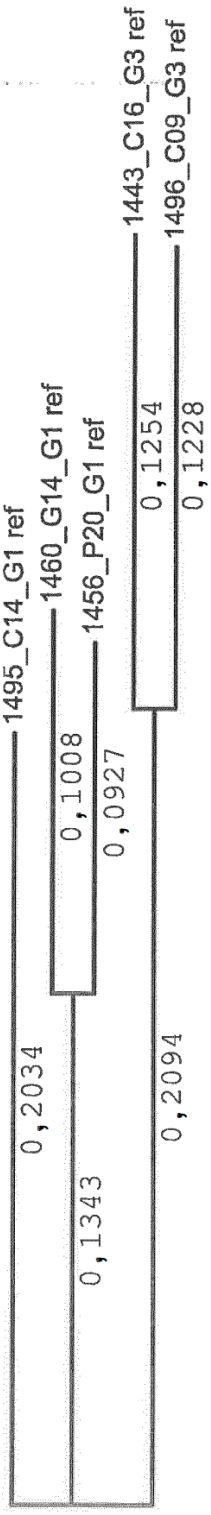


FIG. 1B **Árbol de cadena ligera**

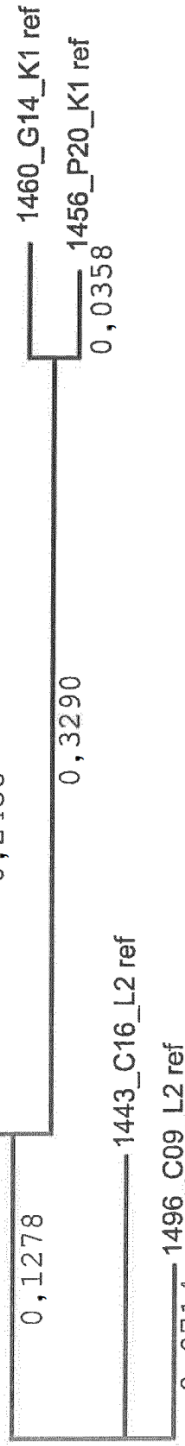


FIG. 2

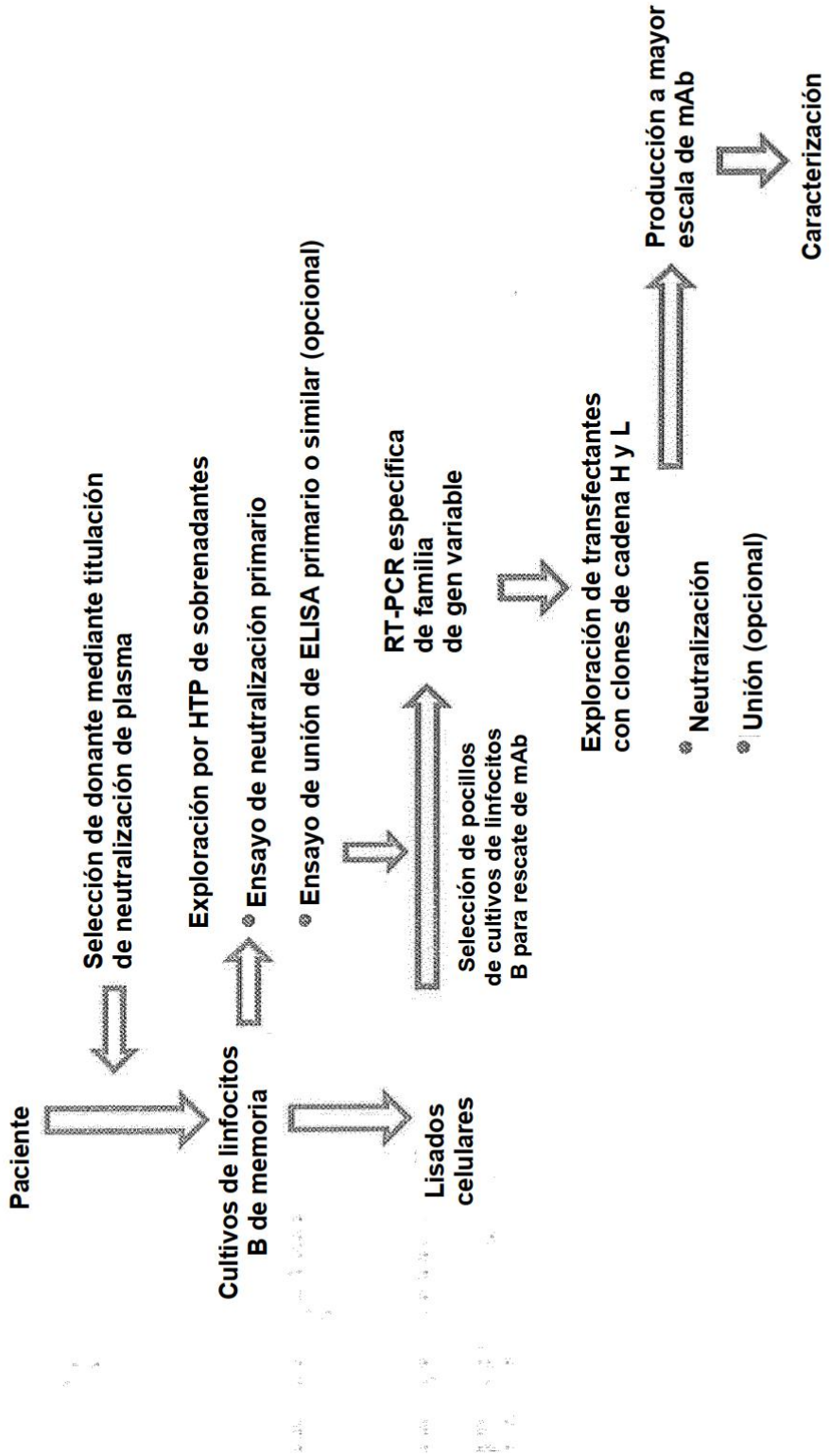
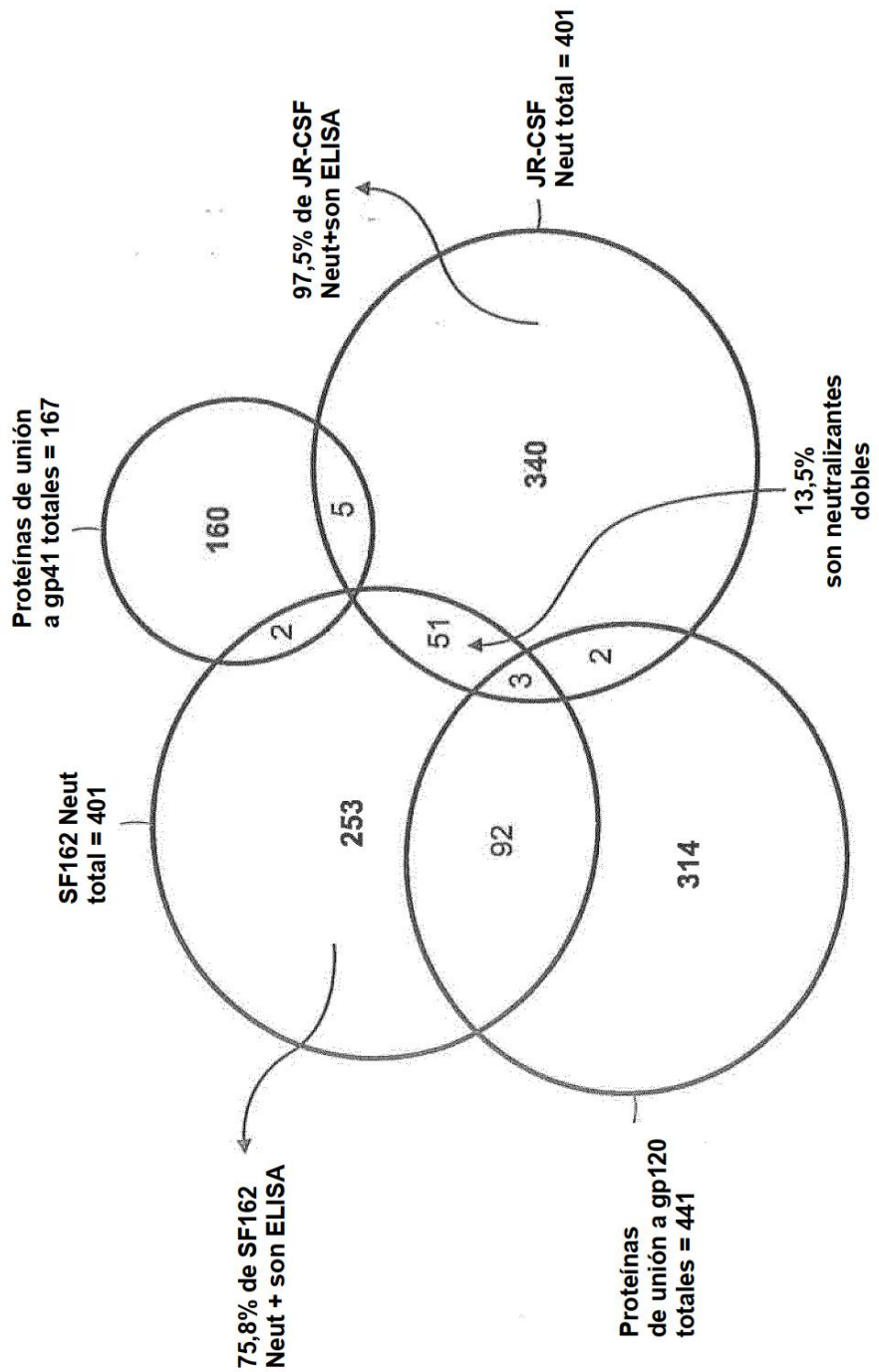

Paciente
Selección de donante mediante titulación de neutralización de plasma
Cultivos de linfocitos B de memoria
Exploración por HTP de sobrenadantes
• Ensayo de neutralización primario
• Ensayo de unión de ELISA primario o similar (opcional)
Lisados celulares
RT-PCR específica de familia de gen variable
Selección de pocillos de cultivos de linfocitos B para rescate de mAb
Exploración de transfectantes con clones de cadena H y L
• Neutralización
• Unión (opcional)
Producción a mayor escala de mAb
Caracterización

FIG. 3A


Proteínas de unión a gp41 totales = 167
SF162 Neut total = 401
JR-CSF Neut total = 401
97,5% de JR-CSF Neut+son ELISA
13,5% son neutralizantes dobles
75,8% de SF162 Neut + son ELISA
Proteínas de unión a gp120 totales = 441
160
2
253
5
340
51
3
92
2
314

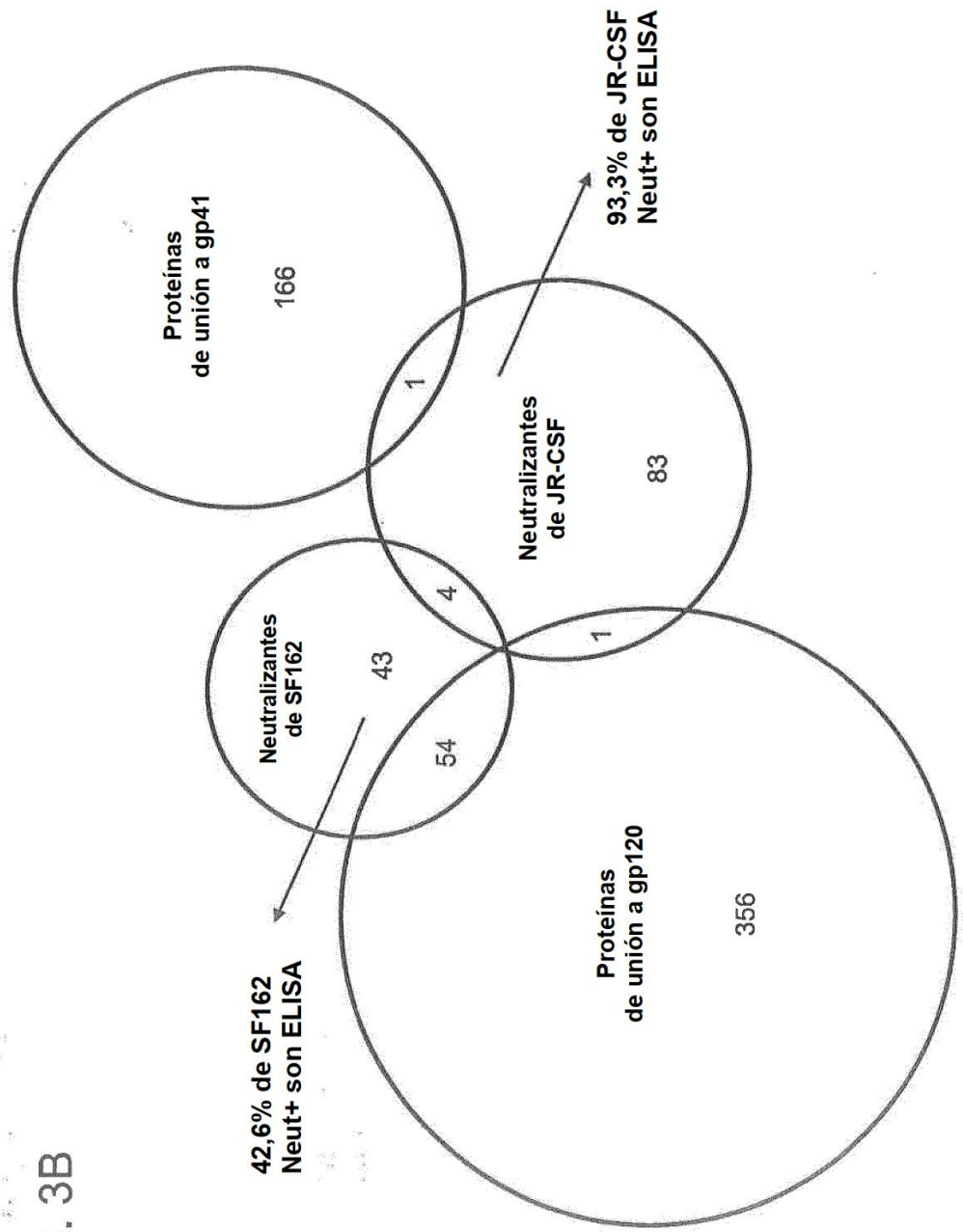

Proteínas
de unión a gp41
166
1
Neutralizantes
de JR-CSF
83
93,3% de JR-CSF
Neut+ son ELISA
4
1
Neutralizantes
de SF162
43
54
Proteínas
de unión a gp120
356
42,6% de SF162
Neut+ son ELISA

FIG. 3B

FIG. 4 Ensayos de neutralización de PG9 y PG16

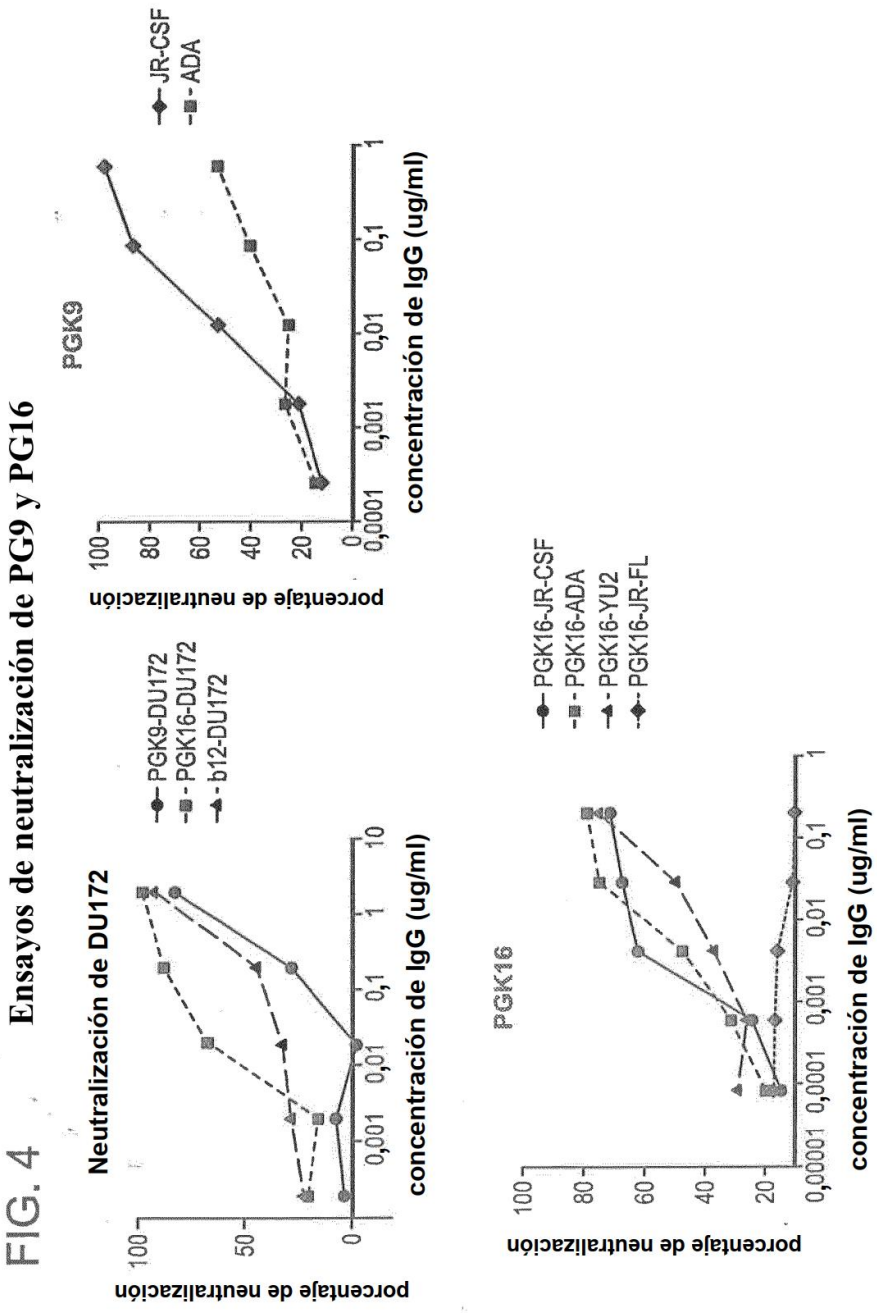
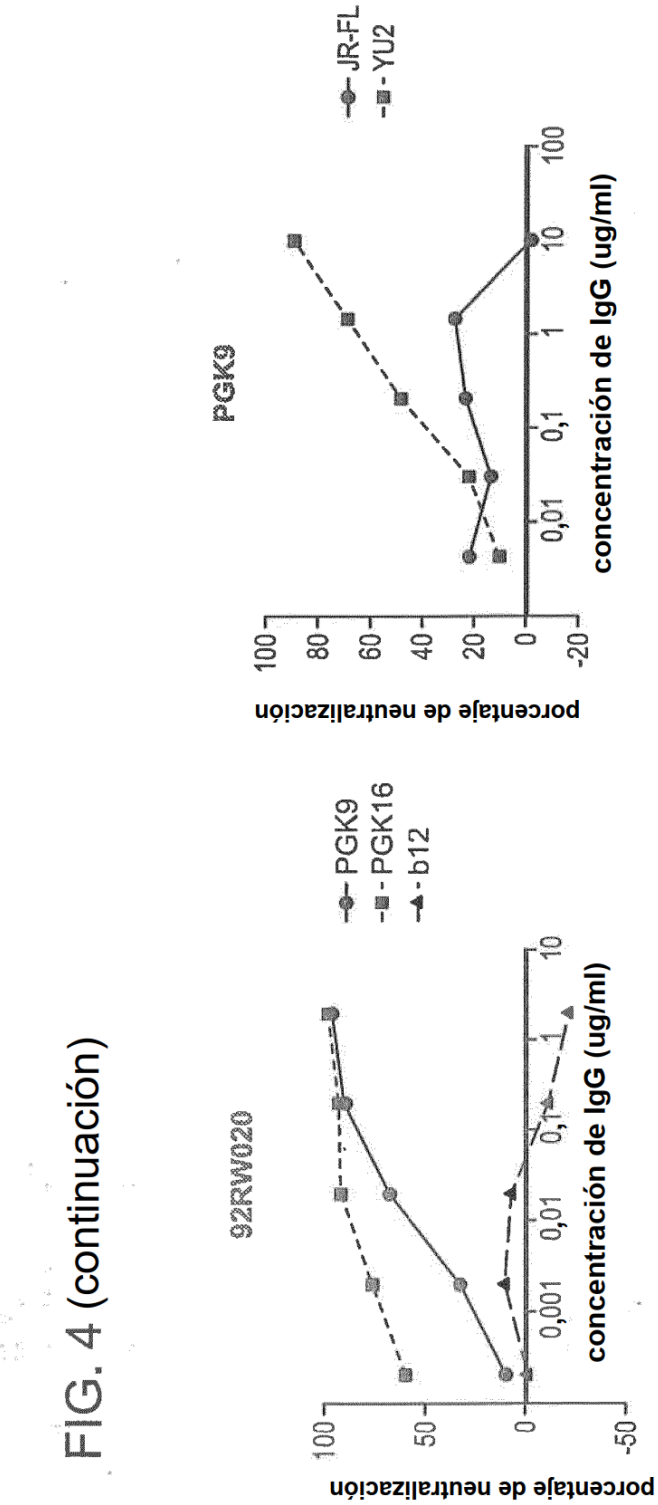


FIG. 4 (continuación)



	Cepa de virus							
	Clado B				Clado C			Clado A
	YU2	JR-FL	JR-CSF	ADA	DU172	ZM214	92RW20	
PGK9	0,4	>10	0,004	0,4	0,6	>2	0,004	
PGK16	<0,1	>10	0,002	<0,1	0,008	>2	<<,004	

FIG. 5

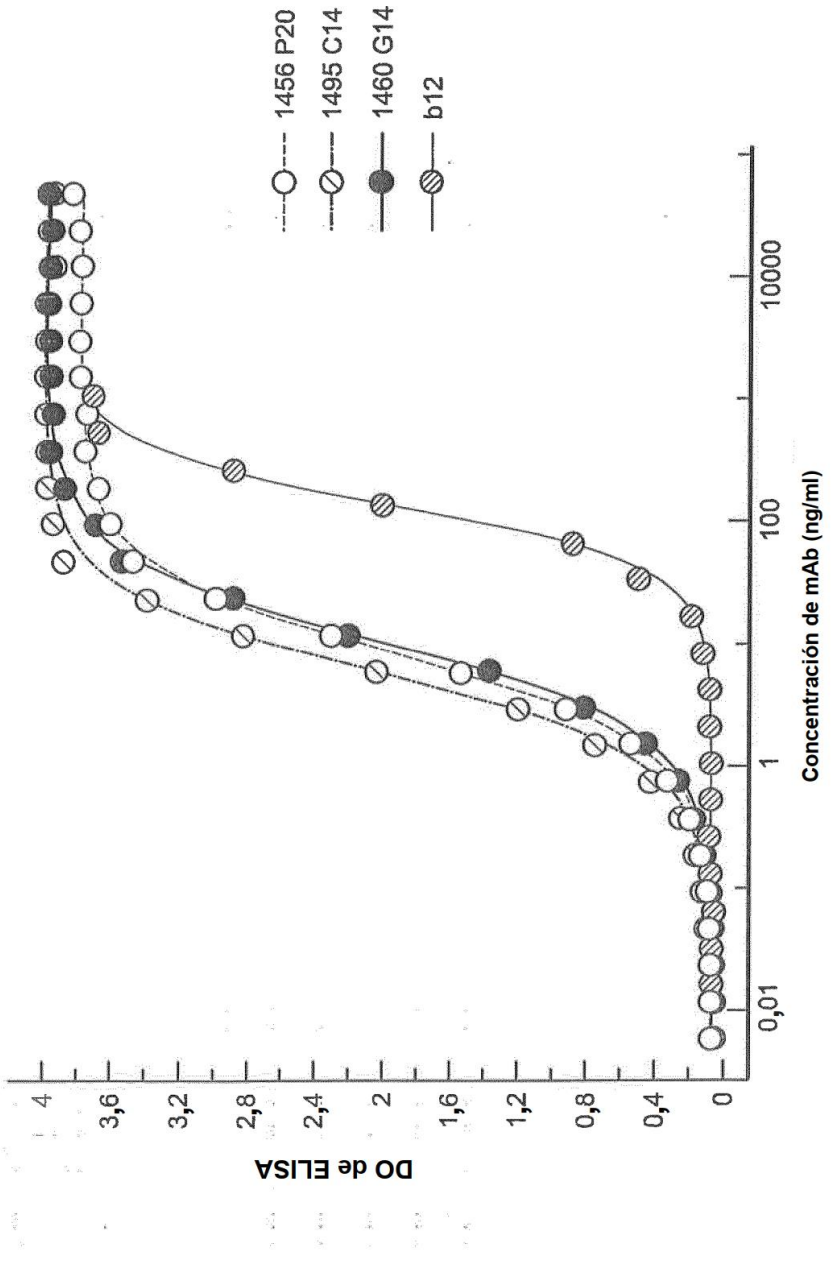

1456 P20
1495 C14
1460 G14
b12
DO de ELISA
0
0,4
0,8
1,2
1,6
2
2,4
2,8
3,2
3,6
4
0,01
1
100
10000
Concentración de mAb (ng/ml)

FIG. 6

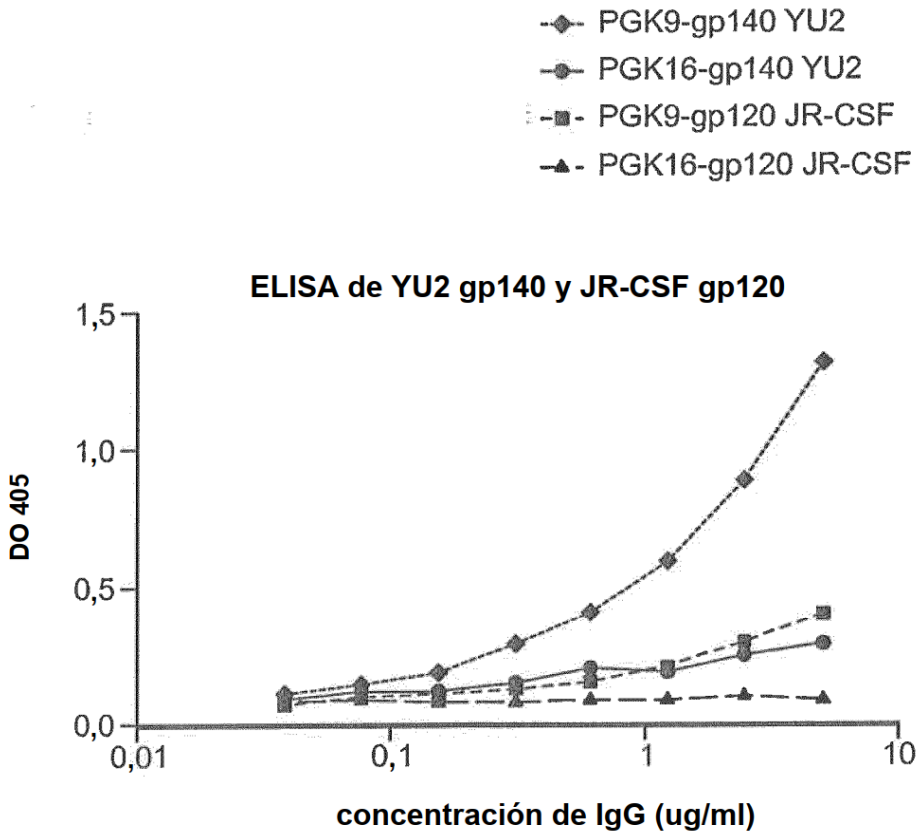

PGK9-gp140 YU2
PGK16-gp140 YU2
PGK9-gp120 JR-CSF
PGK16-gp120 JR-CSF
ELISA de YU2 gp140 y JR-CSF gp120
DO 405
1,5
1,0
0,5
0,0
0,01
0,1
1
10
concentración de IgG (ug/ml)

FIG. 6 (continuación)

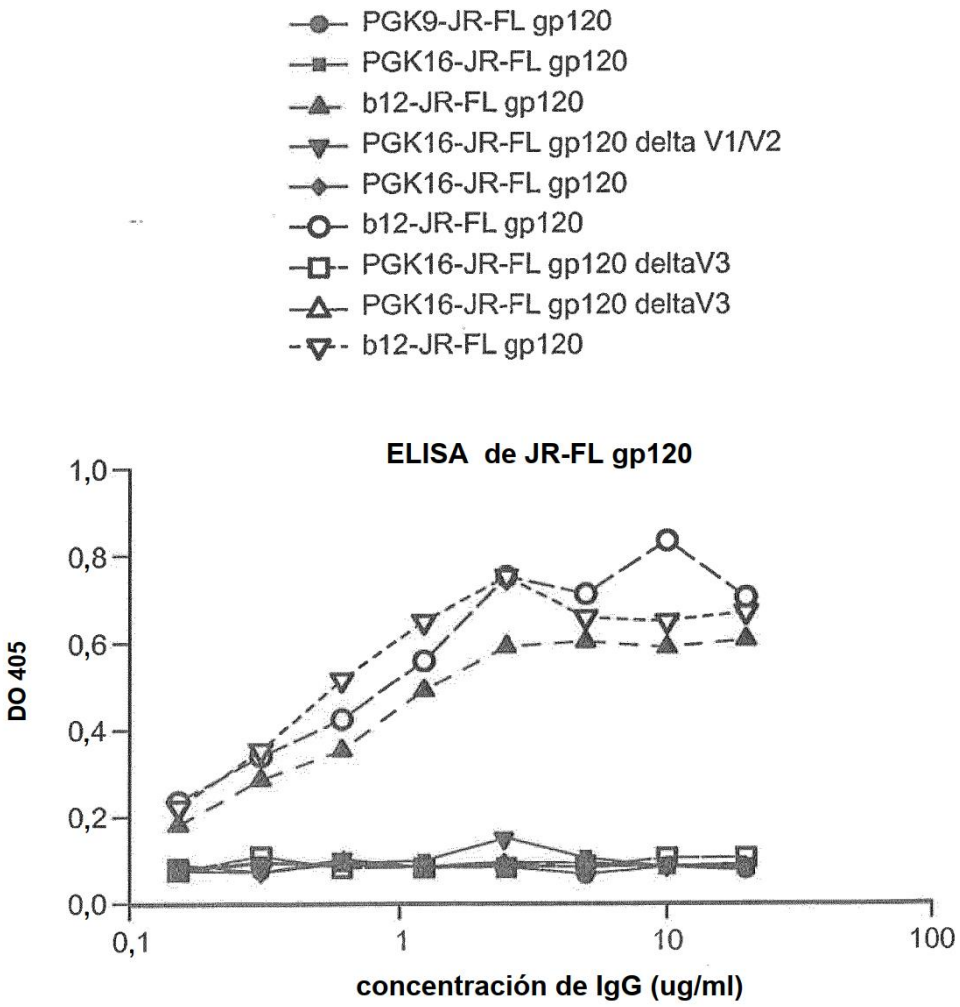
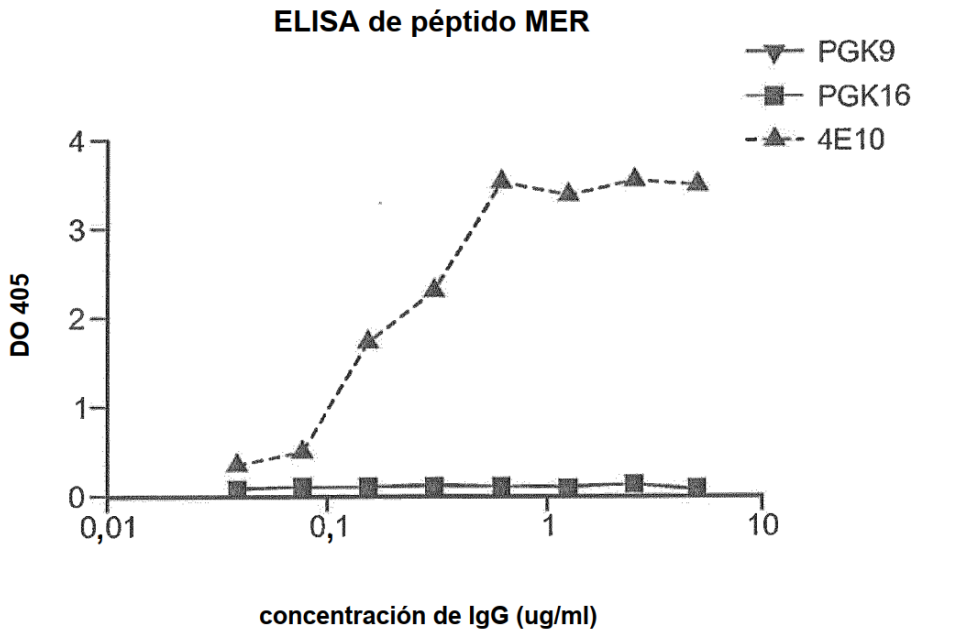


FIG. 6 (continuación)



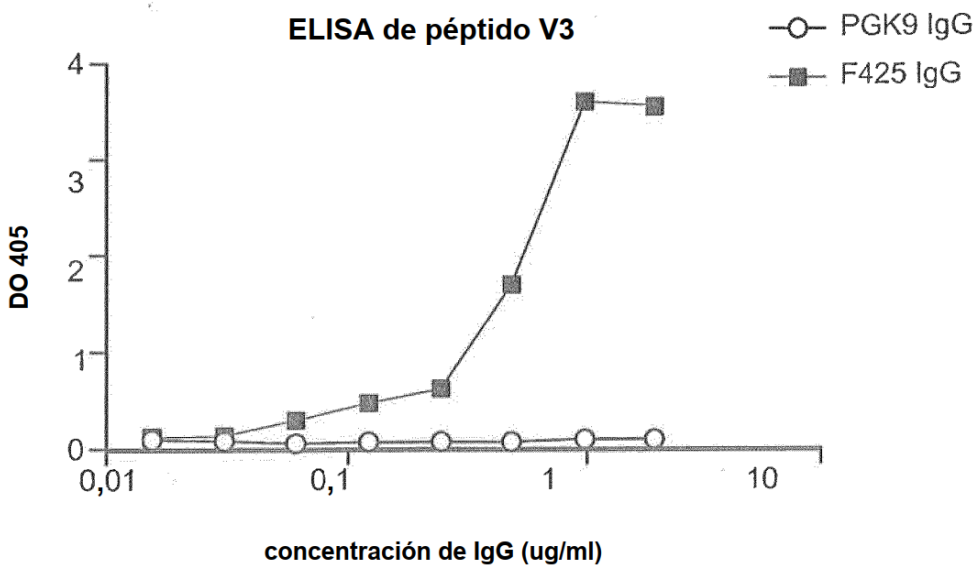


FIG. 7

Unión de PG16 y PG9 con HIV-1YU2 gp160 expresada en superficie celular en presencia y ausencia de sCD4

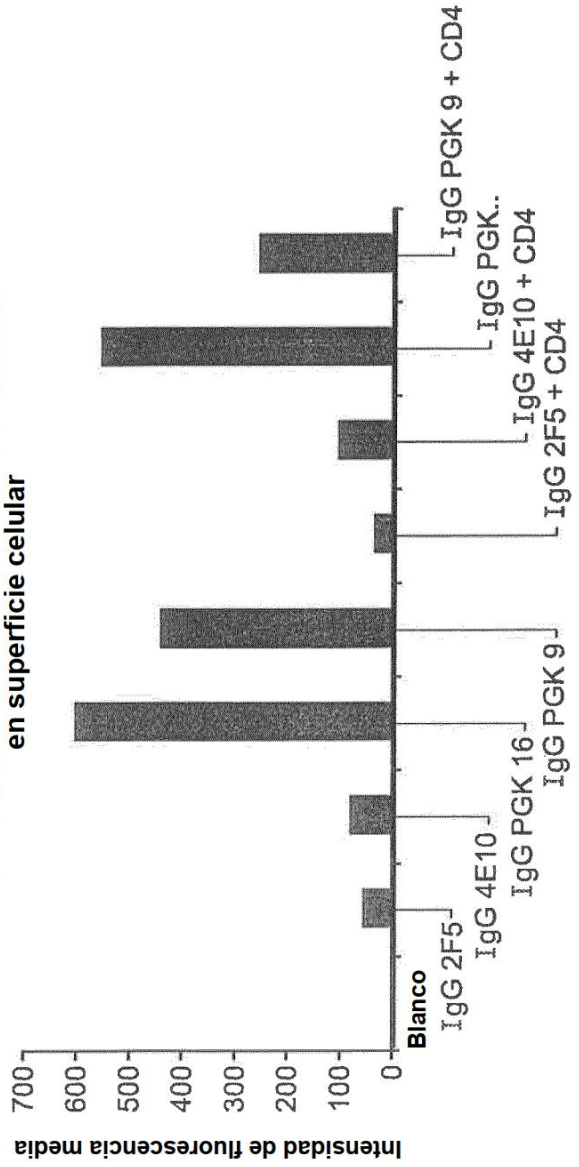


FIG. 8

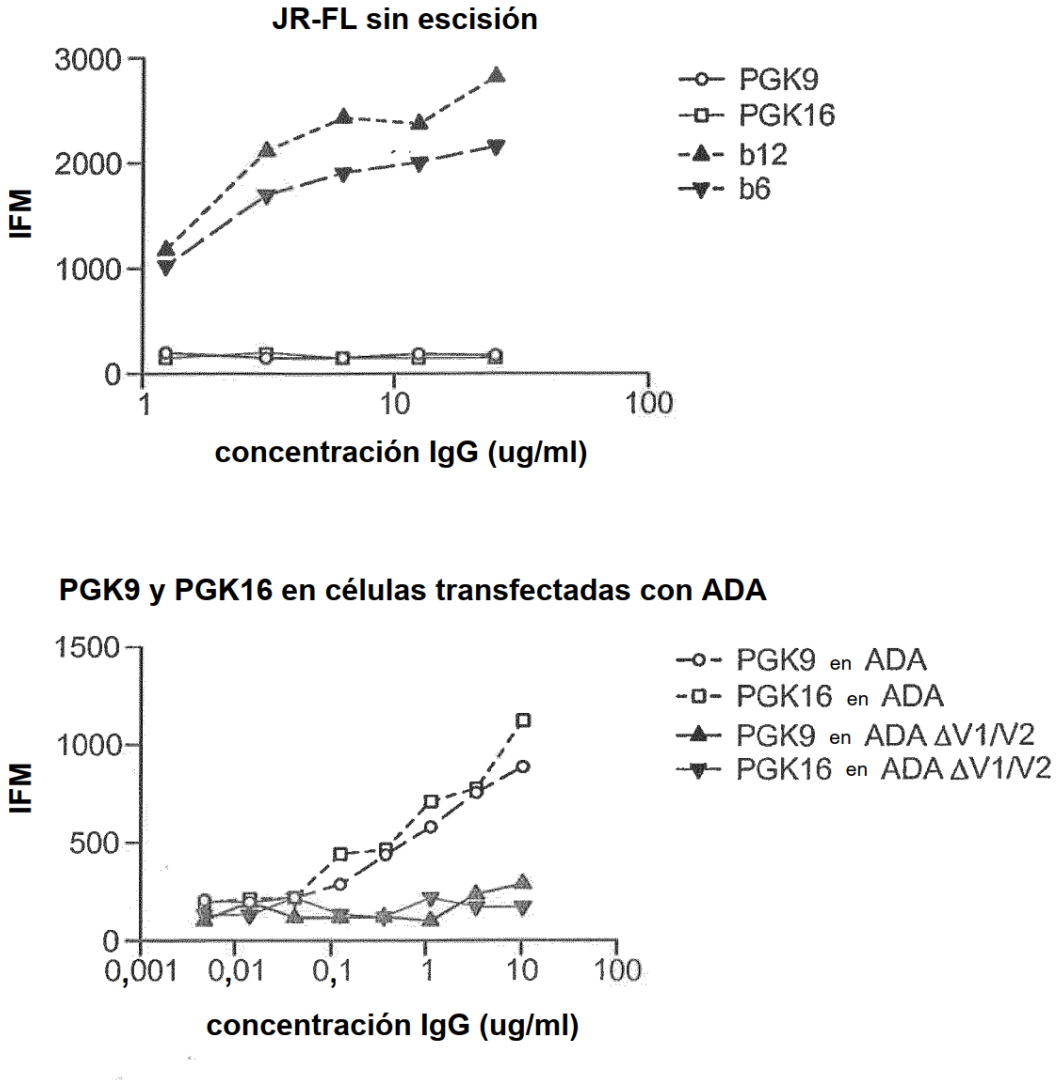
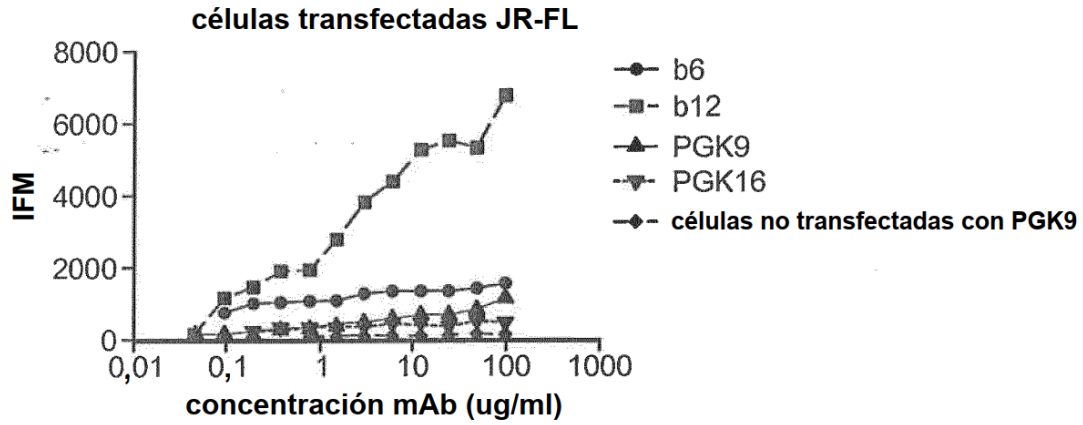
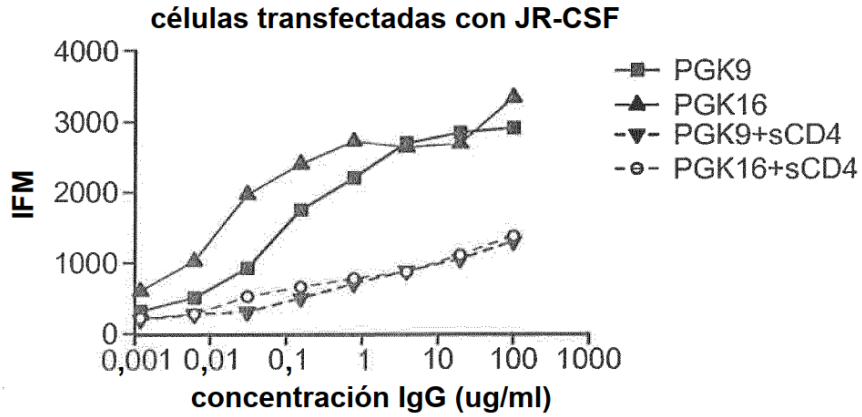

JR-FL sin escisión
IFM
3000
2000
1000
0
1
10
100
concentración IgG (ug/ml)
PGK9
PGK16
b12
b6
PGK9 y PGK16 en células transfectadas con ADA
IFM
1500
1000
500
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
concentración IgG (ug/ml)
PGK9 en ADA
PGK16 en ADA
PGK9 en ADA ΔV1/V2
PGK16 en ADA ΔV1/V2

FIG. 8 (continuación)





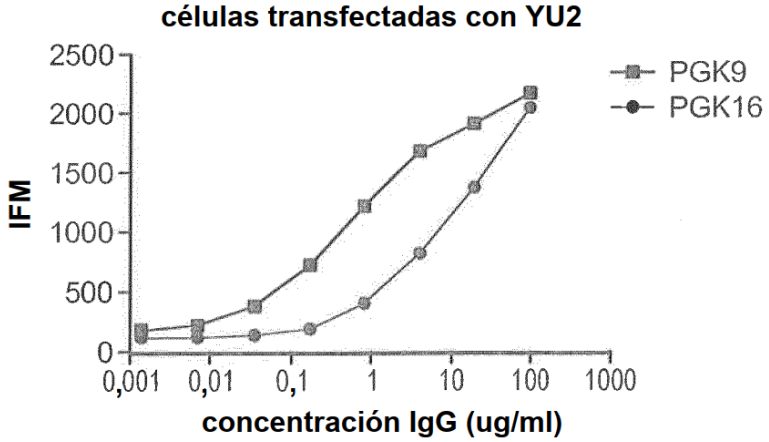
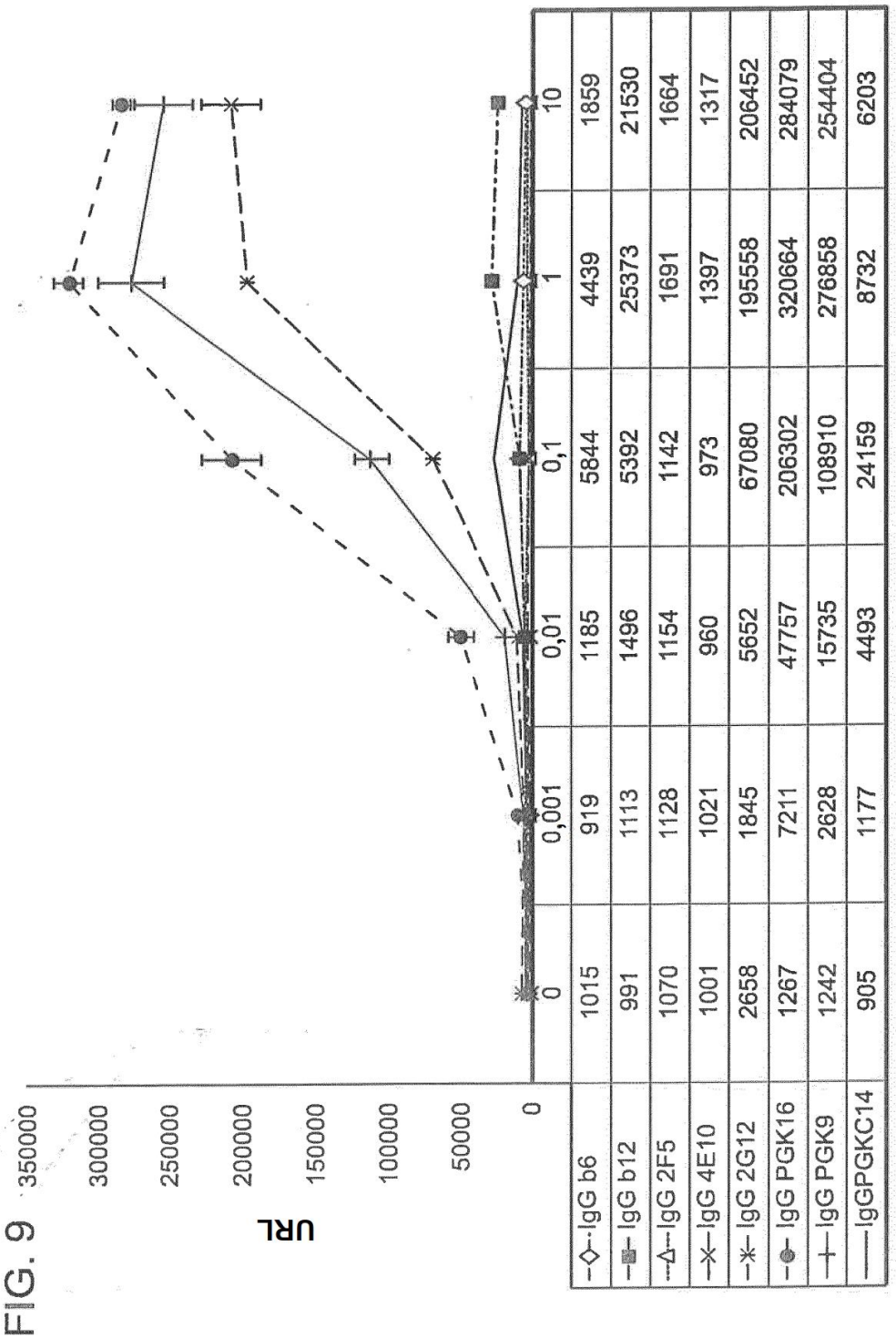
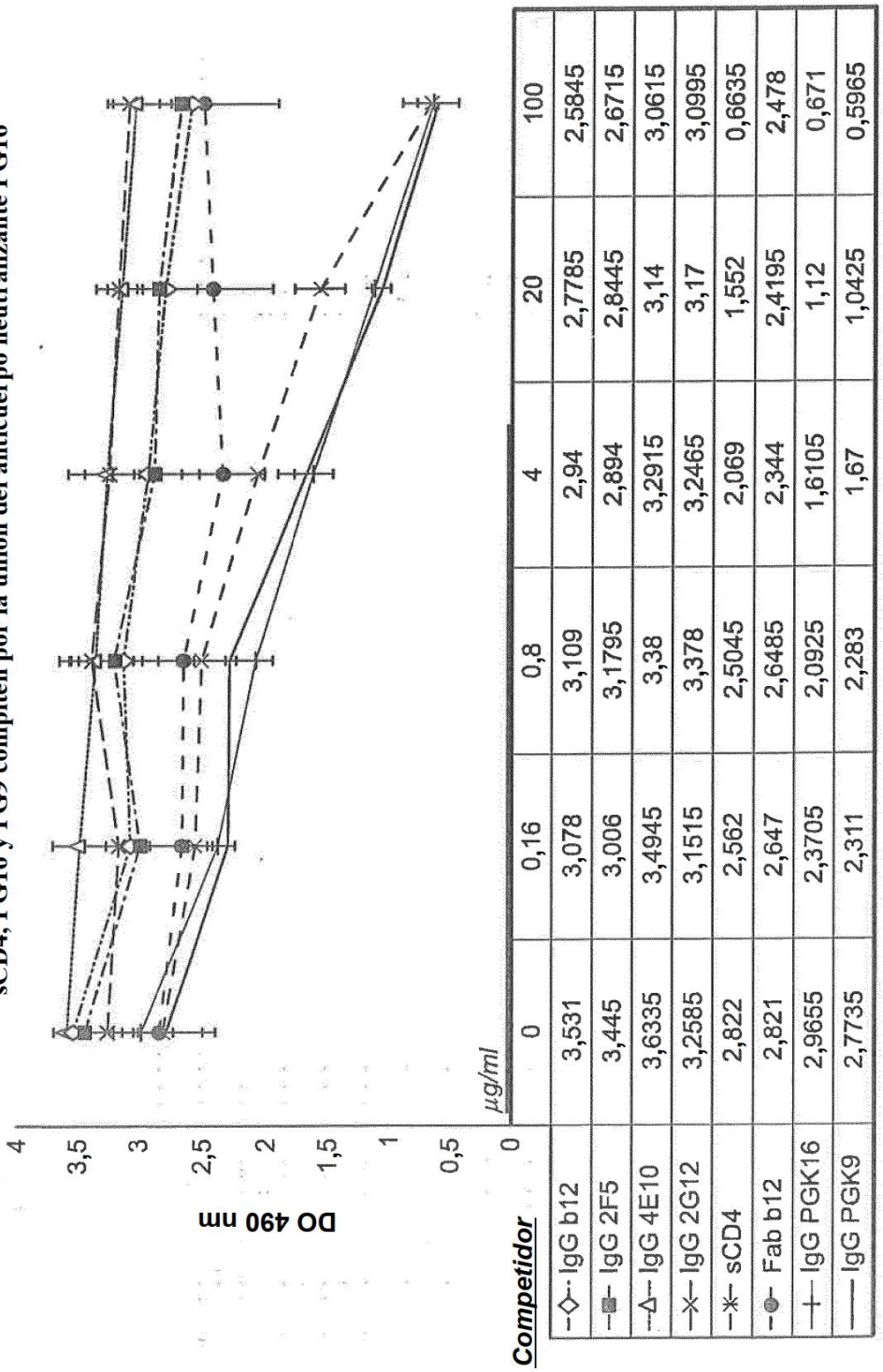


FIG. 9



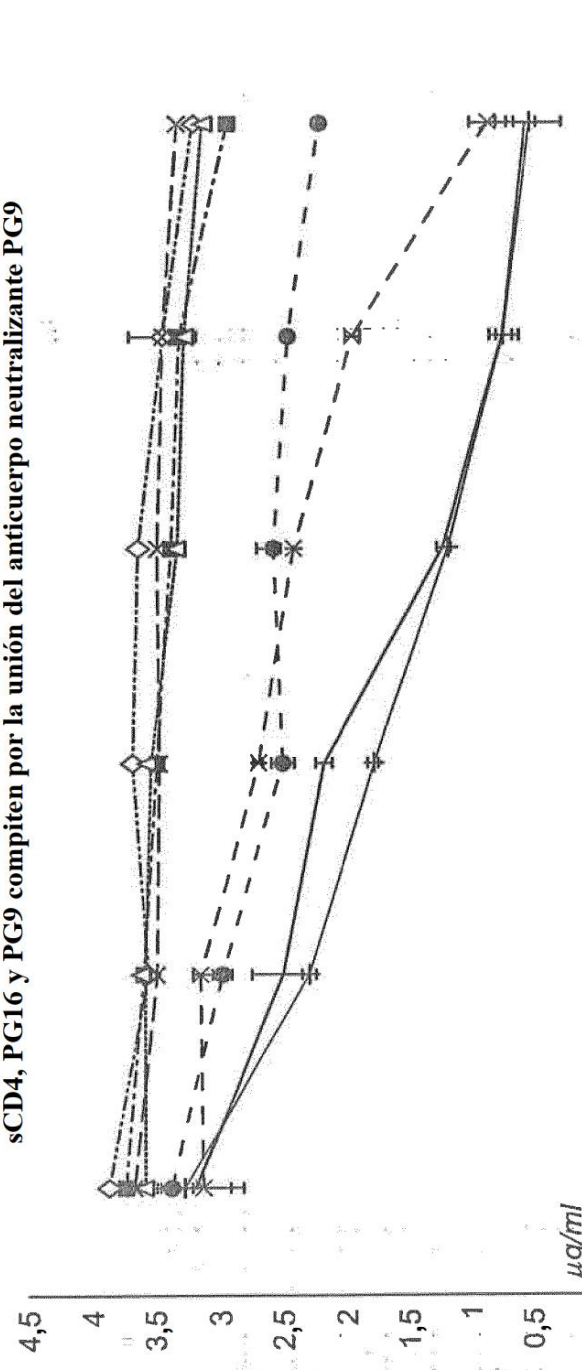
	0	0,001	0,01	0,1	1	10
IgG b6	1015	919	1185	5844	4439	1859
IgG b12	991	1113	1496	5392	25373	21530
IgG 2F5	1070	1128	1154	1142	1691	1664
IgG 4E10	1001	1021	960	973	1397	1317
IgG 2G12	2658	1845	5652	67080	195558	206452
IgG PGK16	1267	7211	47757	206302	320664	284079
IgG PGK9	1242	2628	15735	108910	276858	254404
IgGPGKC14	905	1177	4493	24159	8732	6203

FIG. 10A



Competidor	0	0,16	0,8	4	20	100
IgG b12	3,531	3,078	3,109	2,94	2,7785	2,5845
IgG 2F5	3,445	3,006	3,1795	2,894	2,8445	2,6715
IgG 4E10	3,6335	3,4945	3,38	3,2915	3,14	3,0615
IgG 2G12	3,2585	3,1515	3,378	3,2465	3,17	3,0995
sCD4	2,822	2,562	2,5045	2,069	1,552	0,6635
Fab b12	2,821	2,647	2,6485	2,344	2,4195	2,478
IgG PGK16	2,9655	2,3705	2,0925	1,6105	1,12	0,671
IgG PGK9	2,7735	2,311	2,283	1,67	1,0425	0,5965

FIG. 10B



Competidor	0	0,16	0,8	4	20	100
IgG b12	3,834	3,522	3,6425	3,6095	3,417	3,1835
IgG 2F5	3,7115	3,5455	3,476	3,338	3,278	2,923
IgG 4E10	3,5755	3,513	3,505	3,3065	3,277	3,123
IgG 2G12	3,647	3,4715	3,4425	3,4575	3,411	3,31
sCD4	3,112	3,106	2,672	2,4035	1,9395	0,8495
Fab b12	3,3325	2,963	2,481	2,5565	2,4585	2,202
IgG PGK16	3,248	2,271	1,763	1,1625	0,734	0,526
IgG PGK9	3,154	2,4825	2,1545	1,2055	0,7345	0,5615

FIG. 11A

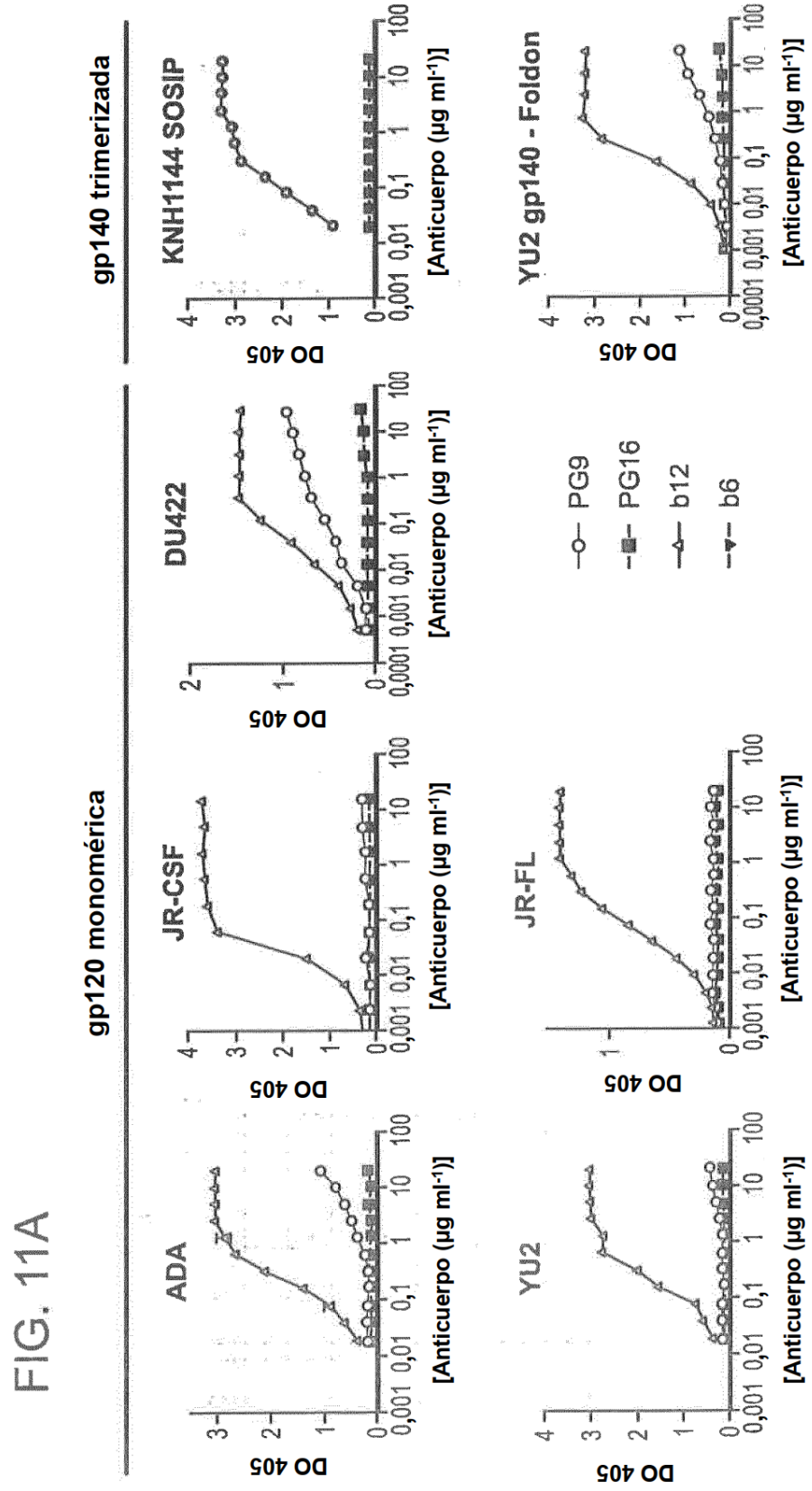

gp120 monomérica
gp140 trimerizada
ADA
JR-CSF
DU422
KNH1144 SOSIP
YU2
JR-FL
YU2 gp140 - Foldon
DO 405
[Anticuerpo (µg ml-1)]
PG9
PG16
b12
b6

FIG. 11B

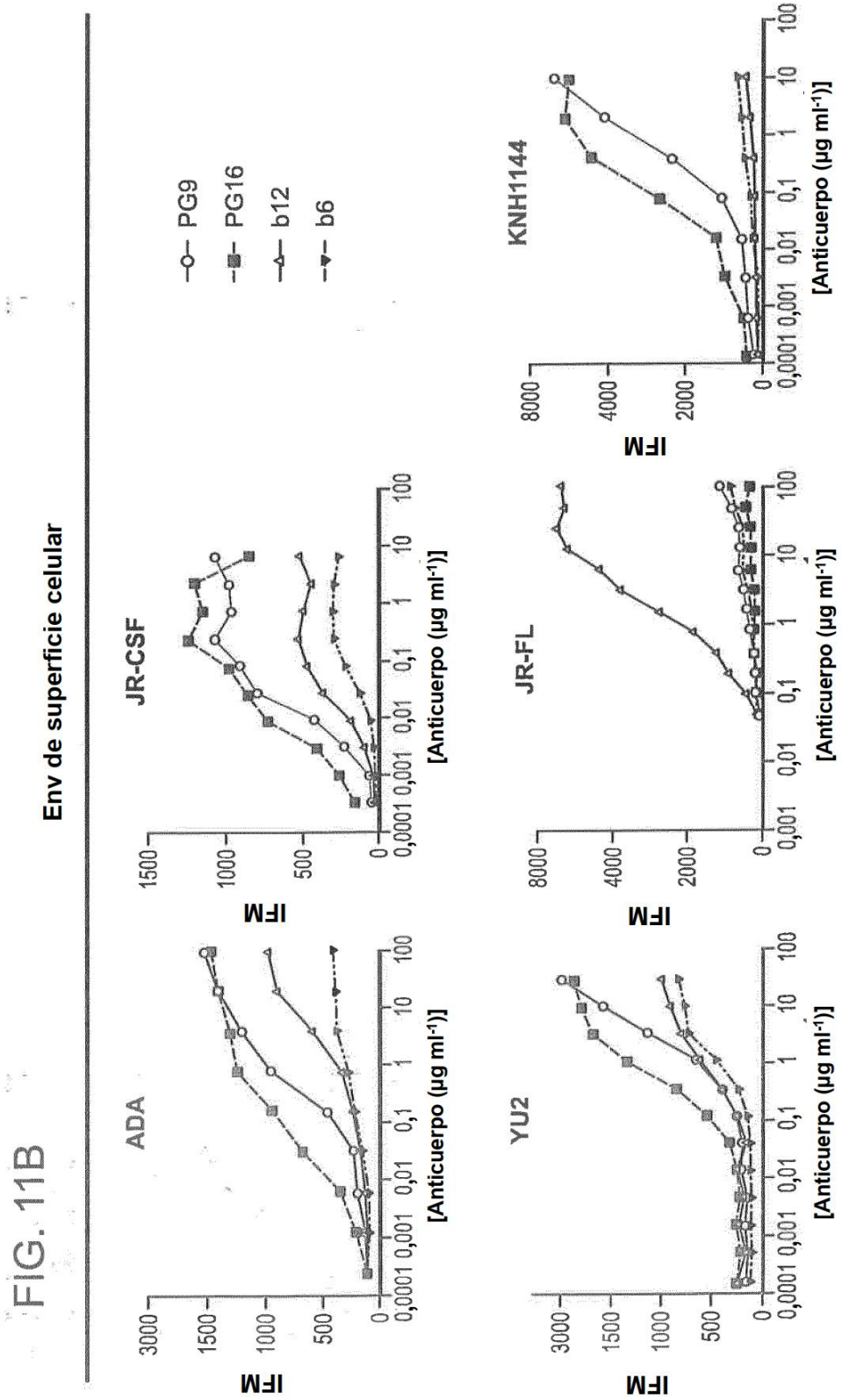

Env de superficie celular
PG9
PG16
b12
b6
ADA
JR-CSF
JR-FL
KNH1144
YU2
IFM
[Anticuerpo (µg ml-1)]

FIG. 12

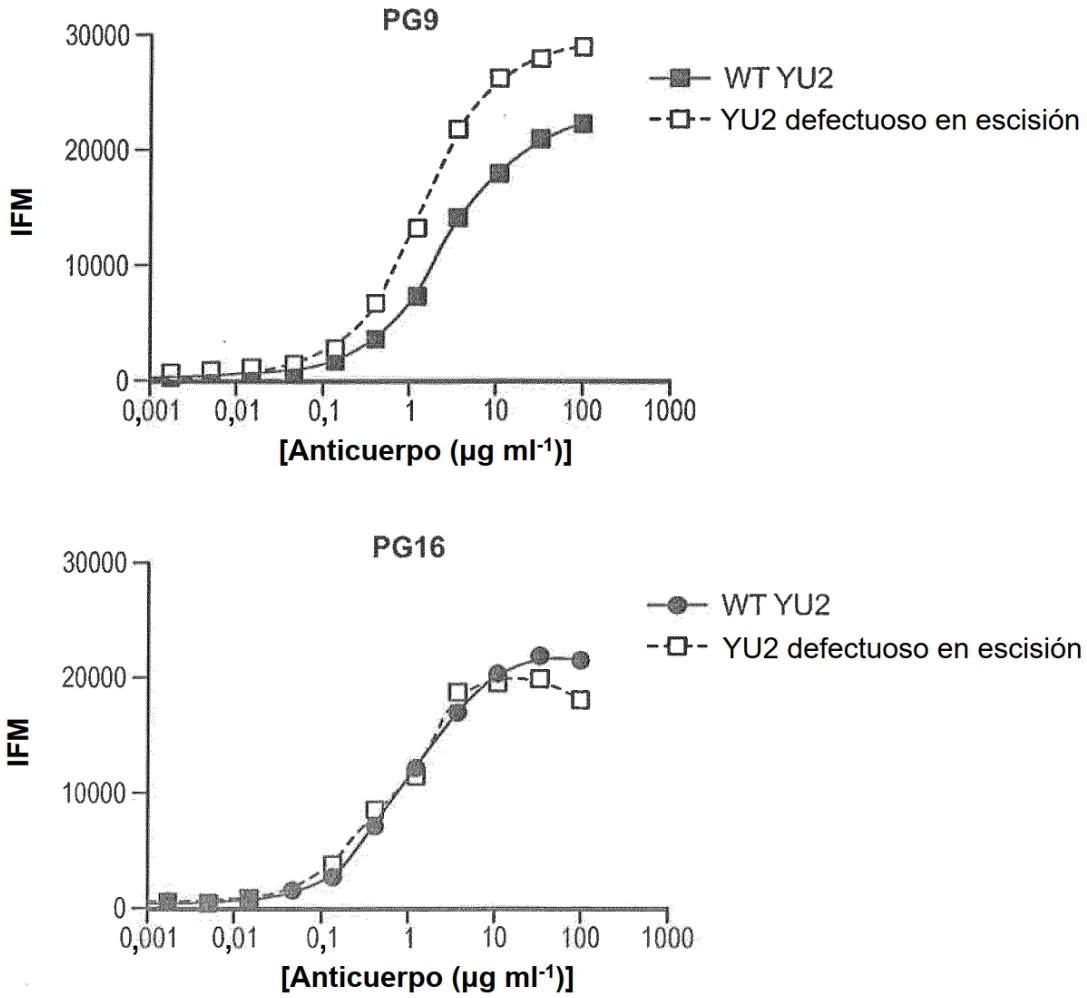

PG9
IFM
30000
20000
10000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
[Anticuerpo (µg ml-1)]
WT YU2
YU2 defectuoso en escisión
PG16
IFM
30000
20000
10000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
[Anticuerpo (µg ml-1)]
WT YU2
YU2 defectuoso en escisión

FIG. 13A

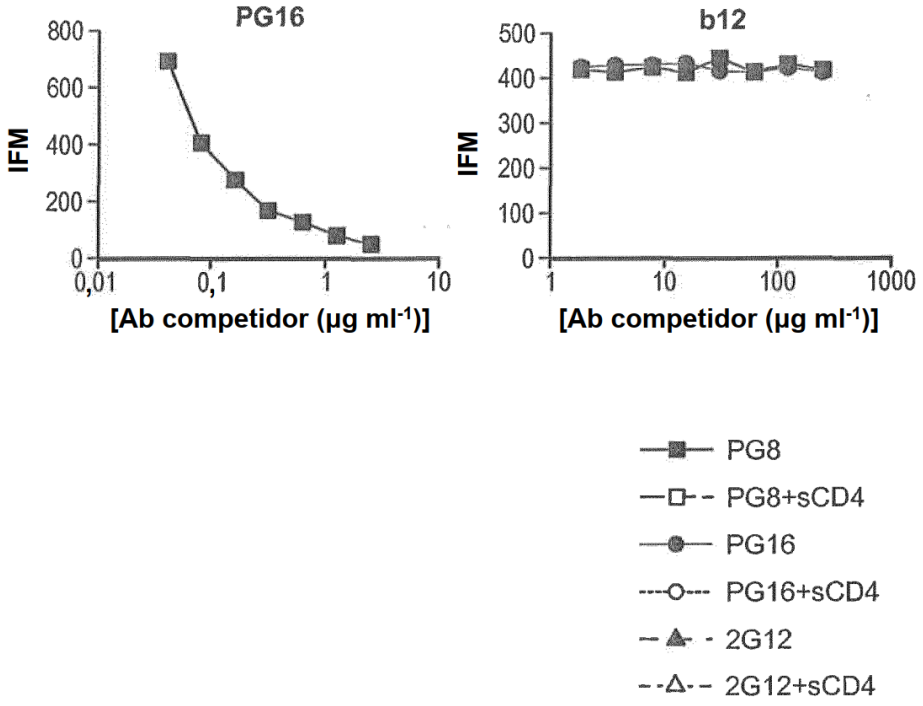


FIG. 13B

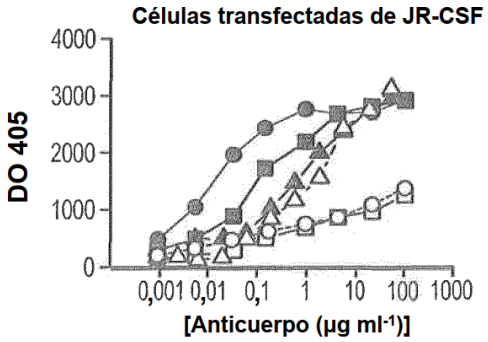


FIG. 13C

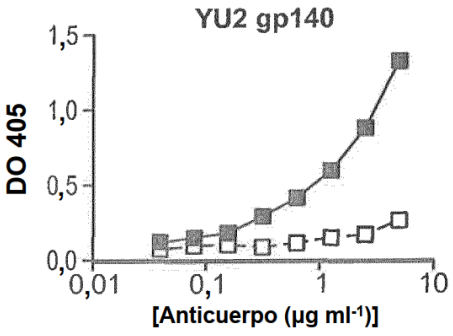


FIG. 13D

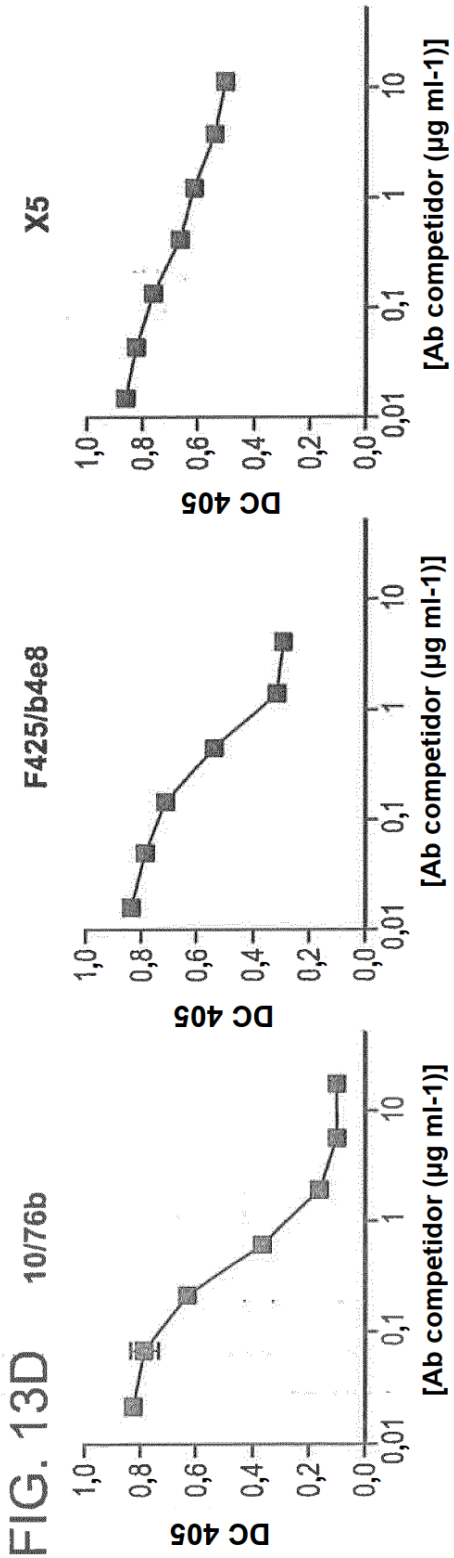


FIG. 13E

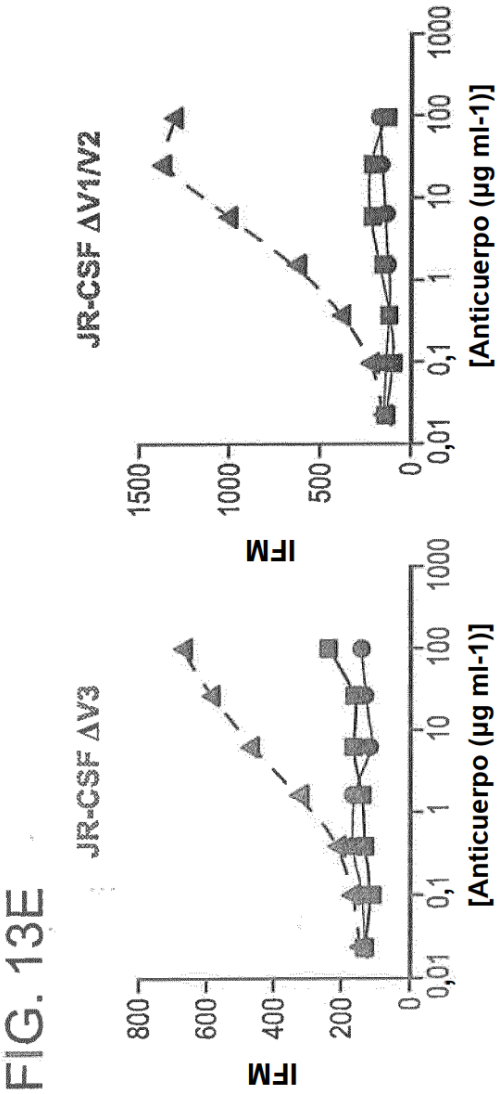


FIG. 14

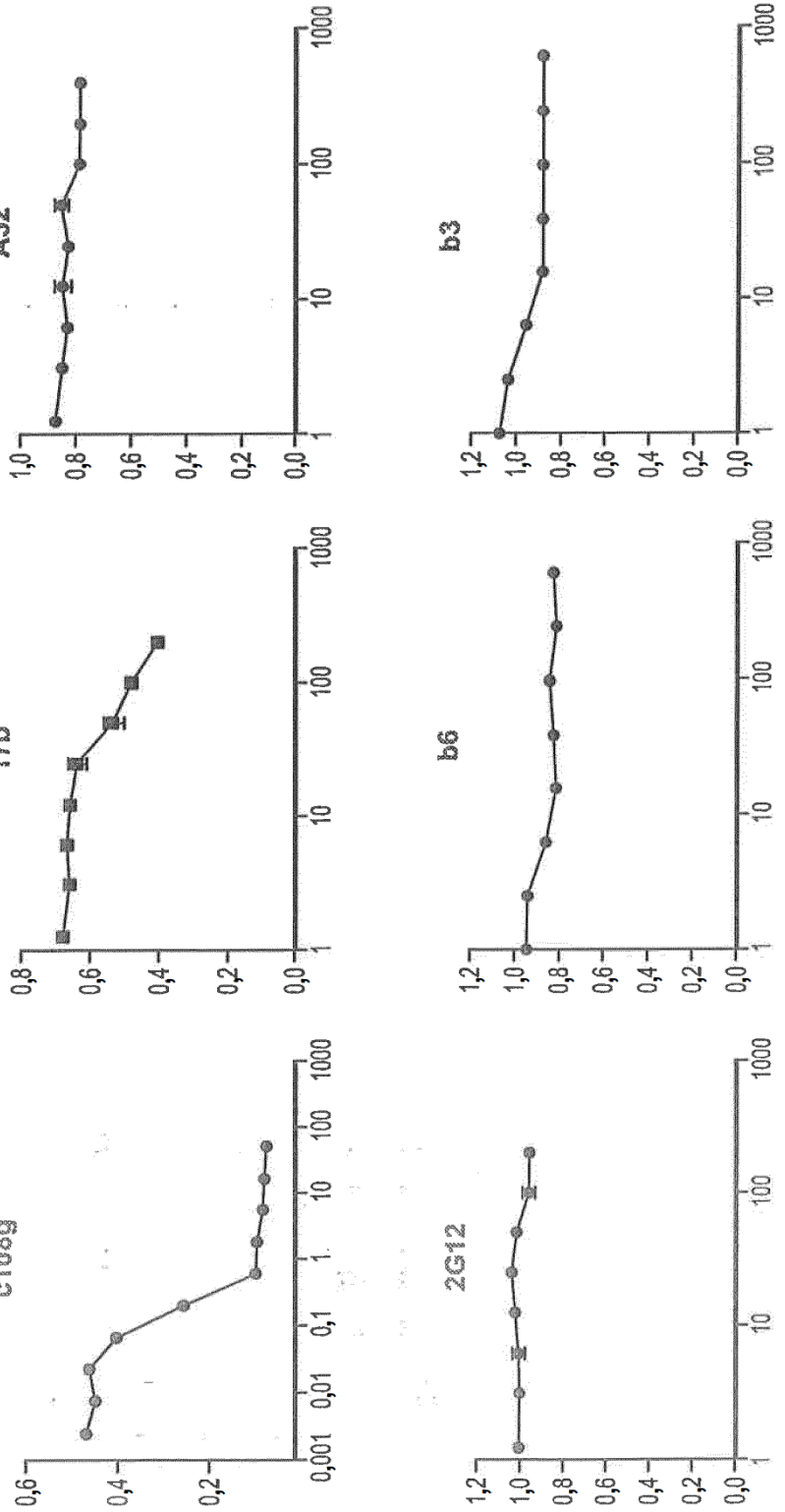

A32
b3
17b
b6
c108g
2G12
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2

FIG. 15

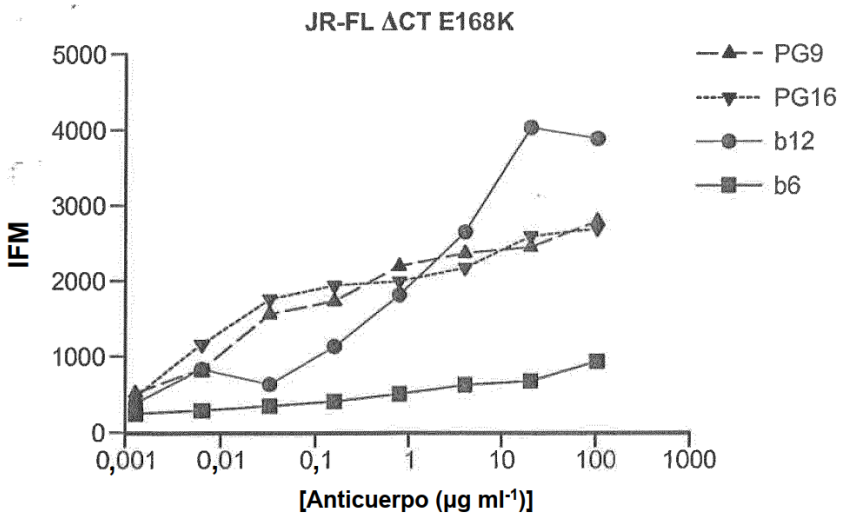

JR-FL ΔCT E168K
IFM
5000
4000
3000
2000
1000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
[Anticuerpo (µg ml-1)]
PG9
PG16
b12
b6

FIG. 16

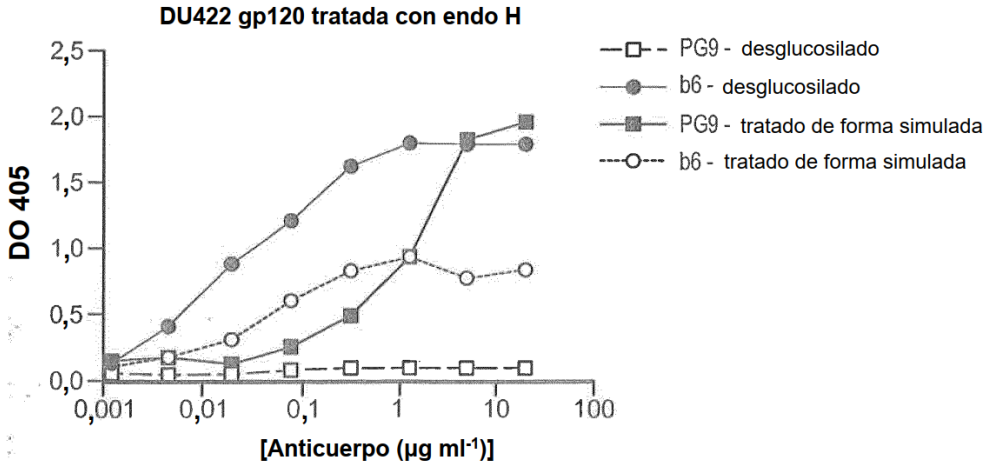
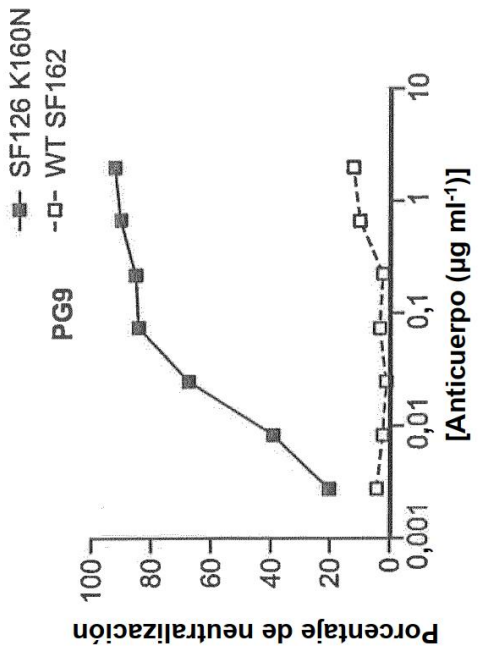

DU422 gp120 tratada con endo H
DO 405
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
[Anticuerpo (µg ml-1)]
PG9 - desglucosilado
b6 - desglucosilado
PG9 - tratado de forma simulada
b6 - tratado de forma simulada

FIG. 17


SF126 K160N
WT SF162
PG9
Porcentaje de neutralización
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
[Anticuerpo (µg ml-1)]

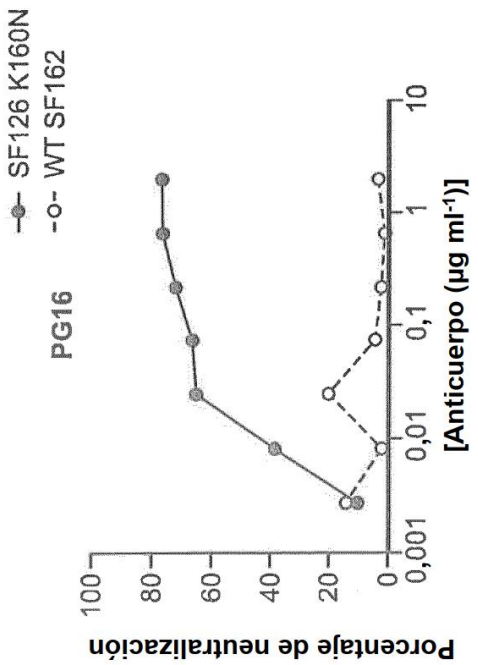

SF126 K160N
WT SF162
PG16
Porcentaje de neutralización
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
[Anticuerpo (µg ml-1)]

FIG. 18

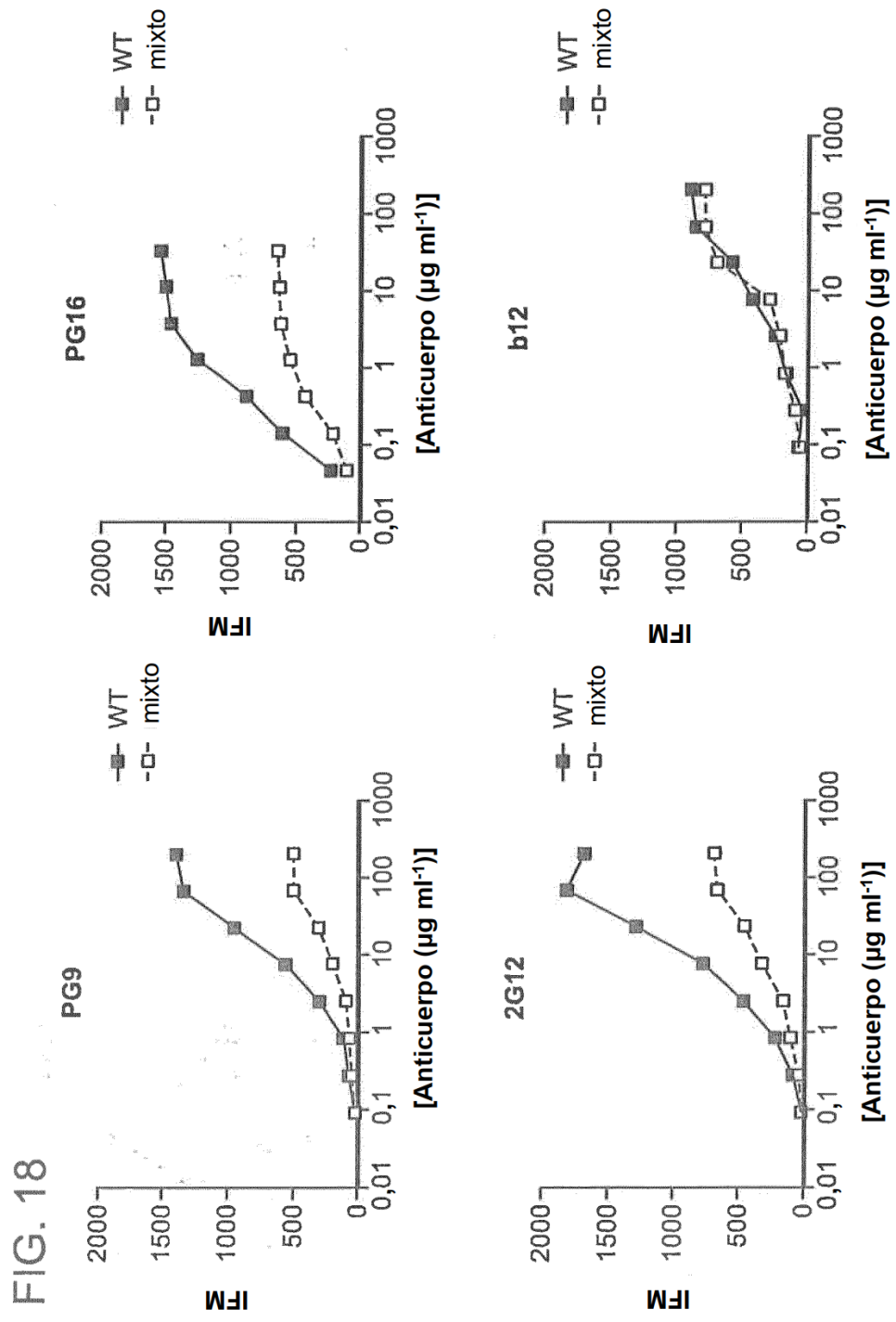

PG9
PG16
2G12
b12
WT
mixto
IFM
2000
1500
1000
500
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
[Anticuerpo (µg ml-1)]

FIG. 19

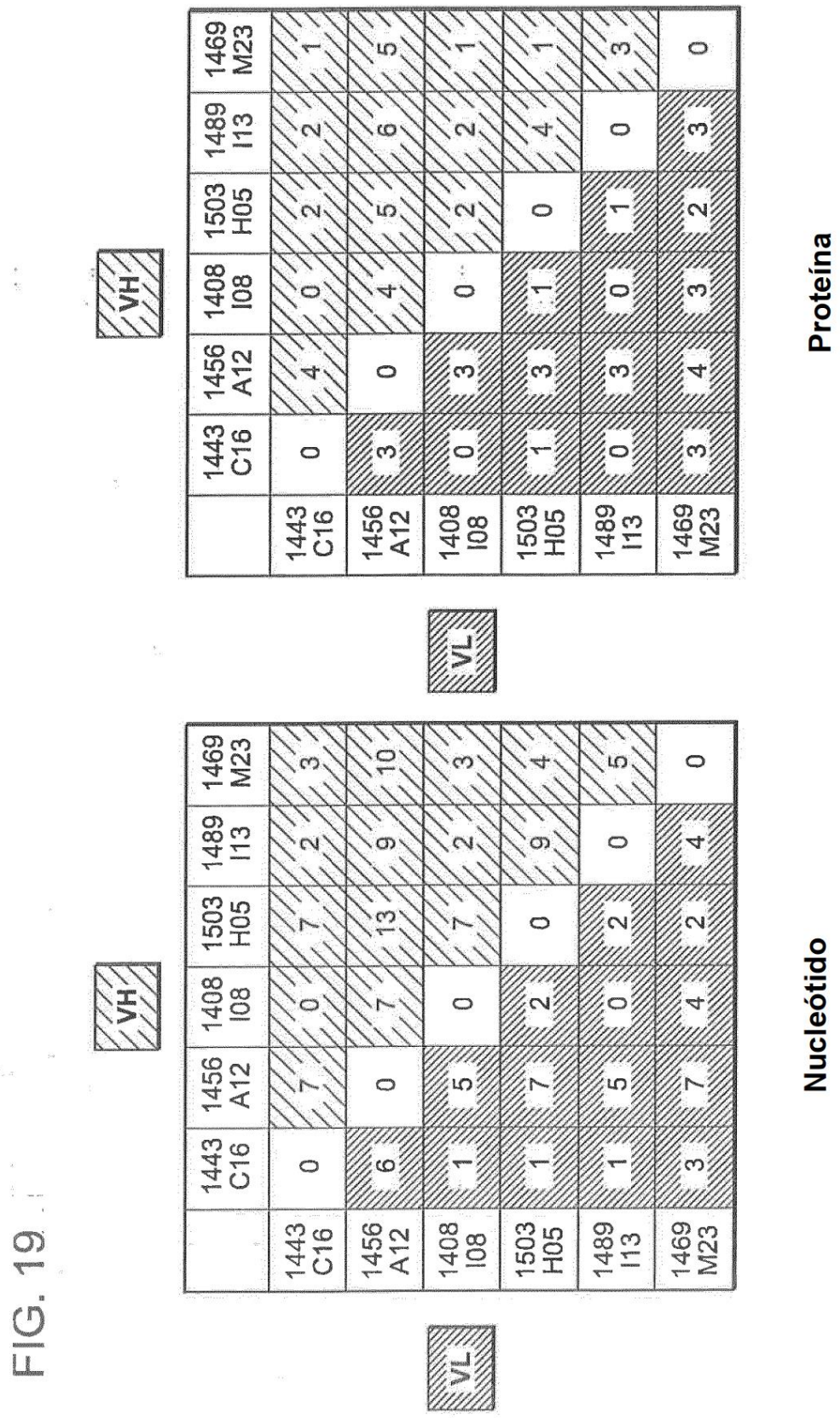

VH
VL
Nucleótido
Proteína
1443 C16
1456 A12
1408 I08
1503 H05
1489 I13
1469 M23

FIG. 20A

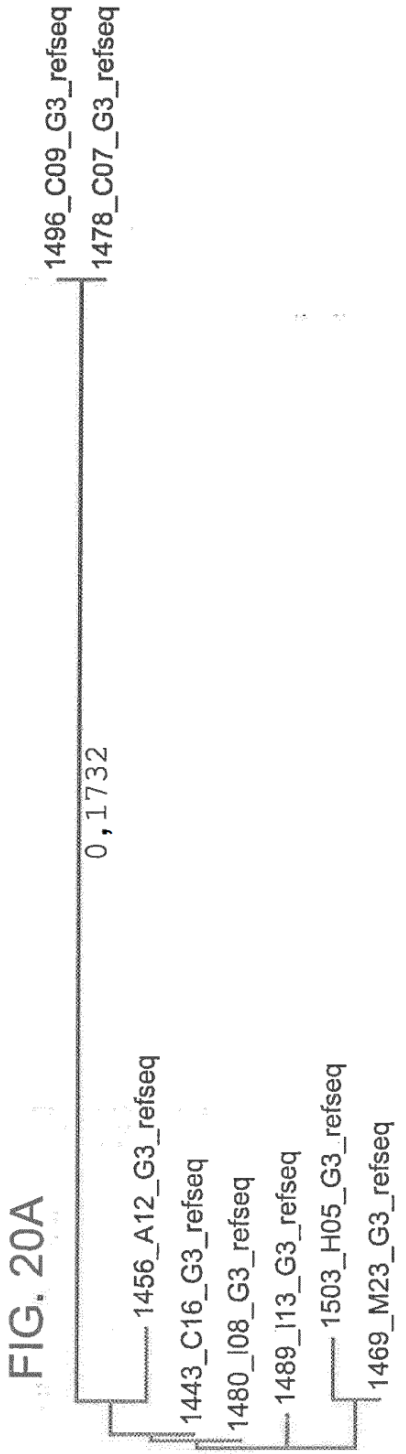


FIG. 20B

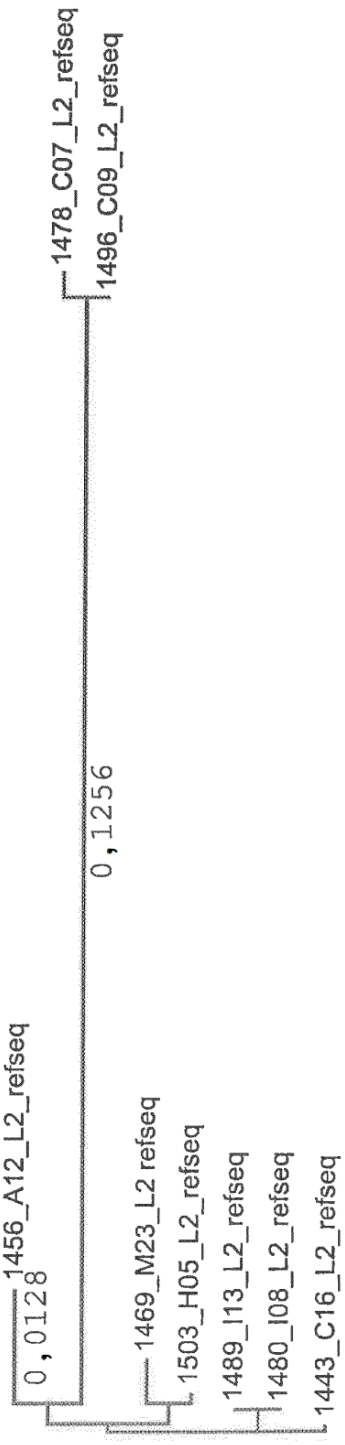


FIG. 21A

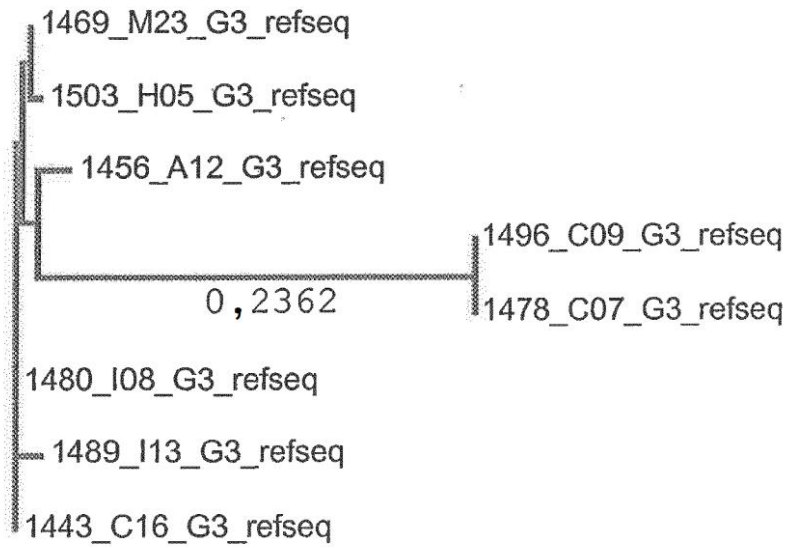


FIG. 21B

