

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 543**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2005 E 10180621 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2336174**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos contra los virus Hendra y Nipah**

30 Prioridad:

14.03.2005 US 661766 P

05.05.2005 US 678547 P

20.09.2005 US 718902 P

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

24.09.2015

73 Titular/es:

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%)

Office of Technology Transfer, National Institutes of Health, Suite 325, 6011 Executive Boulevard Rockville, MD 20852-3804, US y THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

**DIMITROV, DIVITER S;
ZHU, ZHONGYU y
BRODER, CHRISTOPHER C**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 546 543 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales humanos contra los virus Hendra y Nipah

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de la inmunología y, específicamente, a los anticuerpos monoclonales que se unen o neutralizan los virus Hendra y Nipah.

10 Antecedentes de la invención

El virus Nipah (NiV) y el virus Hendra (HeV) son paramixovirus emergentes estrechamente relacionados, que comprenden el género *Henipavirus* (Anónimo 1999 MMWR Morb Mortal Wkly Rep Ward, J. W. ed. 48:335-337; Chew, M. H. et al. 2000 J Infect Dis 181:1760-1763; Chua, K. B. et al, 2000 Ann Neurol 48:802-805; Eaton, B. T. 15 2001 Microbes Infect 3:277-278; Goh, K. J. et al. 2000 N Engl J Med 342:1229-1235; Lee, K. E. et al 1999 Ann Neurol 46:428-432; Lim, C. C. et al. 2000 Am J Neuroradiol 21:455-461; Murray, K. et al. 1995 Science 268:94-97). Los paramixovirus son virus con cubierta que contienen ARN de sentido negativo y contienen dos glucoproteínas principales de la cubierta ancladas a la membrana que son necesarias para la infección de una célula huésped receptora. Todos los miembros contienen una glucoproteína F que participa en la fusión de membranas 20 independiente del pH entre el virus y su célula huésped, mientras que la segunda glucoproteína de unión puede ser una proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), una proteína hemaglutinina (H) o una proteína G, dependiendo del virus particular (revisado en Lamb, R. A. y Kolakofsky, D. 2001 in Fields Virology, eds. Knippe, D. M. & Howley, P. M., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, págs. 1305-1340). Al igual que con todos los paramixovirus, estas glucoproteínas son también los antígenos principales a los que se dirigen prácticamente todos los anticuerpos 25 neutralizantes.

Los amplios tropismos de la especie y la capacidad para provocar una enfermedad mortal tanto en animales como en seres humanos distinguen a HeV y NiV de todos los otros paramixovirus conocidos (revisado en Eaton, B. T. 2001 Microbes Infect 3:277-278). Son patógenos de Nivel 4 de Seguridad Biológica (BSL-4) y están en la agenda de 30 investigación para la biodefensa del NIAID como patógenos prioritarios de categoría C emergentes zoonóticos que se podrían usar como agentes de bioterrorismo. Los henipavirus se pueden amplificar y provocar enfermedad en animales grandes, y se pueden transmitir mediante aerosoles a seres humanos, en los que la enfermedad puede ser una enfermedad respiratoria grave y encefalitis febril. Pueden crecer fácilmente en cultivo celular o en huevos de pollo embrionario, producen títulos no concentrados elevados (DICT₅₀/ml ~10⁸; Cramer, G. et al. 2002 J Virol 35 Methods 99:41-51) y son muy infecciosos (Field, H. et al. 2001 Microbes Infect 3:307-314; Hooper, P. et al. 2001 Microbes Infect 3:315-322).

NiV ha reaparecido recientemente en Bangladesh. Se han confirmado dos brotes de NiV en 2004 e incluso se ha producido otro en enero de 2005 (Anónimo 2005 Communicable Disease Report Weekly (CDR Weekly) Vol. 15 No. 40 16). En estos brotes más recientes se han realizado varias observaciones importantes, incluyendo una mayor incidencia de síndrome de dificultad respiratoria aguda, transmisión de persona a persona y tasas de mortalidad de casos significativamente mayores (60-75 %) que en Malasia (aproximadamente del 40 %), donde se descubrió o se sospechó que se había originado el virus (Anónimo 2004 Wkly Epidemiol Rec 79:168-171; Anonymous 2004 Health and Science Bulletin (ICDDRDB) 2:5-9; Butler, D. 2004 Nature 429:7; Enserink, M. 2004 Science 303:1121; Hsu, V. P. 45 et al. 2004 Emerg Infect Dis 10:2082-2087). Actualmente, no hay ningún tratamiento para individuos infectados por NiV o HeV y no existe ninguna vacuna para la prevención de la enfermedad en poblaciones humanas o de ganado. Aunque se detectaron respuestas de anticuerpos en infecciones provocadas por estos virus, no se han identificado anticuerpos monoclonales humanos (hmAb) frente a ninguno de los virus. Un número de estudios ha demostrado la importancia de los anticuerpos neutralizantes en la recuperación y protección frente a infecciones víricas (Dimitrov, D. S. 2004 Nat Rev Microbiol 2:109-122). Por lo tanto, el desarrollo de hmAb neutralizantes frente a NiV y HeV 50 podría tener implicaciones importantes para la profilaxis e inmunoterapia pasiva. Además, la caracterización de los epítopos de los anticuerpos neutralizantes podría proporcionar información útil para el desarrollo de vacunas y fármacos candidatos. Finalmente, tales anticuerpos se podrían usar para el diagnóstico y como agentes de investigación.

55 J. Virol. 78(2):834-840 (2004) divulga el uso de glucoproteínas G y F del virus Nipah para vacunar hámsteres. Virology 296:190-200 (2002) divulga que las glucoproteínas G y F del virus Nipah inducen una respuesta de anticuerpos neutralizantes en ratones. Virology 271:334-349 (2000) divulga que las proteínas de los virus Nipah y Hendra comparten grados variables de homología de aminoácidos.

60 Transición a la invención

En el presente documento, los inventores notifican la identificación de hmAb neutralizantes potentes dirigidos a la glucoproteína G de cubierta vírica, usando como antígeno una glucoproteína G de HeV soluble (sG) oligomérica, 65 purificada, para la detección selectiva en una gran biblioteca de presentación en fagos humana sin exposición previa. Uno de estos anticuerpos mostró una potencia excepcional frente a HeV infeccioso y otro neutralizó tanto a

HeV como a NiV. Debido a que estos anticuerpos son anticuerpos completamente humanos, sirven como base para la profilaxis y tratamiento de seres humanos infectados con HeV o NiV.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen a o neutralizan los virus Hendra o Nipah. La invención proporciona anticuerpos humanos que retienen la capacidad para unirse a los virus Hendra o Nipah y composiciones farmacéuticas que incluyen tales anticuerpos. La invención proporciona además ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos de la invención y células huéspedes transformadas con ellos. Adicionalmente, la invención proporciona métodos profilácticos, terapéuticos y de diagnóstico que emplean los anticuerpos de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Actividad inhibidora significativamente mayor de IgG1 m101 que Fab m101 en la fusión celular mediada por Env de HeV. Células HeLa-USU se infectaron con recombinantes del virus vacunal que codifican las glucoproteínas F y G de HeV y con un recombinante del virus vacunal que codifica la ARN polimerasa de T7 (células efectoras). Cada tipo de célula diana designado se infectó con el virus vacunal indicador vCB21R, que codifica lacZ de *E. coli*. IgG1 m101 y Fab m101 se preincubaron con células efectoras y después se mezclaron con células diana. El ensayo de fusión celular se llevó a cabo durante 2, 5 horas a 37 °C. La fusión se midió como se describe en el Ejemplo 1. En A se muestra la inhibición de la fusión mediada por Env de HeV por IgG1 m101 y Fab m101 en las células HeLa-ATCC y en B se muestra la de las células PCI-13. El porcentaje de fusión se muestra como función de la concentración de anticuerpos. Las curvas representan el mejor ajuste de los datos experimentales a partir del cual se calcularon las CI_{50} usando el software Prism GraphPad.

Figura 2: Inhibición mediante m101 de la formación de sincitios mediada por Env de HeV. Las células efectoras, preparadas como se describe en la leyenda de la Figura 1, se preincubaron con IgG1 m101, Fab m101 o el anticuerpo control irrelevante (X5 específico del VIH (Moulard, M. et al. 2002 Proc Natl Acad Sci USA 99:6913-6918)) durante 20 minutos a temperatura ambiente; después, 2×10^5 células en 200 μ l se superpusieron sobre monocapas de células PCI-13 confluentes al 80 % colocadas en una placa de 48 pocillos y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada. Se tomaron fotografías usando microscopio de contraste de fases, con un objetivo de 10 aumentos. Se muestran porciones ilustrativas de las fotografías originales que, por claridad, se amplifican electrónicamente. Las fotos superior e inferior del panel izquierdo muestran la formación de sincitios en ausencia de anticuerpo o en presencia de un anticuerpo control; se contaron 17 o 20 células fusionadas gigantes (sincitios) por vista fotográfica completa, respectivamente. Las fotos superior e inferior del panel derecho muestran la inhibición completa de la formación de sincitios mediante IgG1 m101 o la reducción a 10 μ g/ml mediante Fab m101 en el número de sincitios; había 0 o 9 sincitios por vista completa, respectivamente.

Figura 3. Inmunoprecipitación de glucoproteínas G de HeV y NiV mediante los Fab anti-glucoproteína G. Se infectaron células HeLa con WR, un virus vacunal control o un virus vacunal recombinante que expresa la glucoproteína G de HeV o la glucoproteína G de NiV marcada con myc, y, comenzando 6 horas de después de la infección, se marcaron con [³⁵S] metionina-cisteína a 37 °C durante la noche. Los lisados se obtuvieron en tampón que contiene Triton X-100 y se incubaron con diversos Fab o con 9E10 de ratón anti-myc durante al menos 1 hora a 4 °C y después se precipitaron con proteína G Sepharose. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante SDS-PAGE al 10 %, seguido de autorradiografía. WR representa un control, en el que las células se infectaron con el virus vacunal de tipo salvaje; X5 es un anticuerpo control específico de gp 120 del VIH, y 9E10 es un anticuerpo anti-c-Myc que sirve como control positivo. También se muestran los geles para m108 y m109. Las flechas al lado de G representan la posición de las bandas correspondientes a la G monomérica.

Figura 4. Competición entre anticuerpos anti-G y efrina-B2 por la unión a la glucoproteína G de Hendra. Fab m101, IgG1 m101 y Fab m106, diluidos en serie, se mezclaron con G de Hendra y se añadieron al receptor vírico efrina-B2 revestido sobre el fondo de una placa de 96 pocillos y la cantidad de G unida se midió como se describe en el Ejemplo 1. Como control, se usó un Fab específico de la proteína S de SARS-CoV.

Figura 5. Unión de m101 y m102 a mutantes de alanina de la proteína G de HeV. Células HeLa transfectadas con G de HeV de tipo salvaje, diversos mutantes de alanina de G de HeV o pMC02 (vector vacío), se infectaron con el virus vacunal WR para llevar a cabo la expresión, se radiomarcaron con [³⁵S] metionina-cisteína toda la noche, se lisaron en tampón que contiene Triton X-100 y se sometieron a inmunoprecipitación mediante m101, m102, o antisueros contra G policlonales de conejo. Los lisados se precipitaron después con proteína G Sepharose y se analizaron mediante SDS-PAGE al 10 %, seguido de autorradiografía.

Figura 6. Comparación de la actividad inhibidora de m101, m102.4 Fab e IgG1, y m102 Fab en la fusión celular mediada por Env de HeV. Células HeLa-USU se infectaron con recombinantes del virus vacunal que codifican las glucoproteínas F y G de HeV y con un recombinante del virus vacunal que codifica la ARN polimerasa de T7 (células efectoras). La célula diana U373 se infectó con el virus vacunal indicador vCB21R, que codifica lacZ de *E. coli*. Los anticuerpos diluidos en serie se preincubaron con las células efectoras durante 0,5 horas y después se mezclaron con células diana. El ensayo de fusión celular se llevó a cabo durante 2,5 horas a 37 °C. La fusión se midió como se describe en el Ejemplo 1. Las concentraciones de anticuerpos se representaron gráficamente frente al ensayo de Beta-Gal, leyendo a 595 nm.

5 Figura 7. Actividad inhibidora de m102.4 Fab e IgG1 significativamente mayor que la de m102 Fab en la fusión celular mediada por NiV-Env. Células HeLa-USU se infectaron con recombinantes del virus vacunal que codifican las glucoproteínas F y G de NiV y con un recombinante del virus vacunal que codifica la ARN polimerasa de T7 (células efectoras). La célula diana U373 se infectó con el virus vacunal indicador vCB21R, que codifica lacZ de *E. coli*. Los anticuerpos se preincubaron con las células efectoras durante 0,5 horas y después se mezclaron con células diana. El ensayo de fusión celular se llevó a cabo durante 2,5 horas a 37 °C. La fusión se midió como se describe en el Ejemplo 1. Las concentraciones de anticuerpos se representaron gráficamente frente al ensayo de Beta-Gal, leyendo a 595 nm.

Figura 8. CDR1-3 y FR1-4 para mutantes m101-117 y m102.

Tabla A. Breve descripción de las SEC ID N° de m101-m117

Fab/mab	SEC ID N° de la cadena pesada								SEC ID N° de la cadena ligera							
	V _H	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	V _L	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
M101	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
m102	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
m103	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
m104	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
m105	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
m106	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
m107	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
m108	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
m109	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
m110	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
m111	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176
m112	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
m113	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208
m114	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224
m115	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
m116	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256
m117	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272

Tabla B. Breve descripción de las SEC ID N° del mutante m102

Mutante m02	SEC ID N° de la cadena pesada								SEC ID N° de la cadena ligera							
	VH	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
m102.2	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288
m102.3	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304
m102.4	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
m102.5	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336
m102.11	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352
m102.12	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368
m102.13	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384
m102.15	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
m102.16	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416

Descripción detallada de la forma de realización preferida

El virus Hendra (HeV) y el virus Nipah (NiV) son virus emergentes estrechamente relacionados, que comprenden el género *Henipavirus* de los *Paramyxoviridae*. Cada uno tiene un amplio tropismo de especie y puede provocar una elevada mortalidad en huéspedes tanto animales como humanos. Estos virus infectan células mediante un suceso de fusión de membranas independiente del pH, mediado por sus proteínas de cubierta (Env) de unión (G) y de fusión (F). Se seleccionaron siete Fab, m101-7, en busca de su unión significativa a una forma soluble de G de Hendra (sG), que se usó como el antígeno para producir una gran biblioteca de anticuerpos humanos sin exposición previa. Los Fab seleccionados inhibieron en diversos grados la fusión celular mediada por las Env de HeV o de NiV y la infección vírica. La conversión del neutralizante más potente de HeV infeccioso, Fab m101, en IgG1 aumentó significativamente su actividad inhibidora de la fusión celular – la CI_{50} disminuyó más de 10 veces hasta aproximadamente 1 µg/ml. La IgG1 m101 también fue excepcionalmente potente neutralizando el HeV infeccioso; la neutralización total (100 %) se logró con 12,5 µg/ml, y la neutralización del 98 % sólo necesitó 1,6 µg/ml. La inhibición de la fusión y la infección se correlacionó con la unión de los Fab a glucoproteína G de longitud completa, según se mide mediante inmunoprecipitación, y se correlacionó menos con la unión a sG, según se mide mediante ELISA y Biacore. M101 y m102 compitieron con la efrina-B2, que se identificó recientemente como un receptor funcional para HeV y NiV, lo que indica un posible mecanismo de neutralización mediante estos anticuerpos. Los anticuerpos m101, m102 y m103 compitieron entre sí, lo que indica que se unen a epítomos solapantes que son distintos de los epítomos de m106 y m107. En un intento inicial por localizar los epítomos de m101 y m102, se midió su unión a un panel de 10 mutantes de barrido de alanina de G y se identificó un resto, G183, que disminuye la unión tanto de m101 como de m102 a G; está localizado en la base de la cabeza globular de la proteína G, según una estructura modelo, y podría ser parte del epítomo del anticuerpo que no solapa en G con el sitio de unión al receptor. Estos resultados indican que m101-7 son específicos de HeV o NiV, o de ambos, y muestran diversa actividad neutralizante; son los primeros anticuerpos monoclonales humanos identificados frente a estos virus, y se contemplan para su uso en el tratamiento, profilaxis y diagnóstico, y como reactivos de investigación y sirven como base para vacunas.

Definiciones

A menos que se defina otra cosa, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Véase, por ejemplo, Singleton P y Sainsbury D., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 3ª ed., J. Wiley & Sons, Chichester, New York, 2001, y Fields *Virology* 4ª ed., Knipe D.M. y Howley P.M. eds, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001

Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” significa una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, que tiene la capacidad para unirse específicamente a un antígeno particular. Los anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la materia de inmunología. Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” significa no solo moléculas de anticuerpos de longitud completa, sino también fragmentos de moléculas de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse al antígeno. Tales fragmentos también son bien conocidos en la técnica y se emplean de forma habitual tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” significa no solo moléculas de inmunoglobulina de longitud completa sino también fragmentos activos de unión a antígeno, tales como los fragmentos activos bien conocidos $F(ab')_2$, Fab, Fv y Fd.

Como se usan en el presente documento las expresiones “enfermedad del virus Hendra” y “enfermedad del virus Nipah” se refieren a enfermedades provocadas, directa o indirectamente, por la infección con virus Hendra o Nipah. Los amplios tropismos de la especie y la capacidad para provocar una enfermedad mortal tanto en animales como en seres humanos distinguen a los virus Hendra (HeV) y Nipah (NiV) de todos los otros paramixovirus conocidos (Eaton, B. T. 2001 *Microbes Infect* 3:277-278). Estos virus se pueden amplificar y provocar enfermedad en animales grandes, y se pueden transmitir a seres humanos, en los que la enfermedad se manifiesta como una enfermedad respiratoria grave y encefalitis febril.

Como se usa en el presente documento con respecto a los polipéptidos, la expresión “sustancialmente puro” significa que los polipéptidos están esencialmente libres de otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza o sistemas *in vivo* en un grado práctico y apropiado para su uso previsto. En particular, los polipéptidos son suficientemente puros y están suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de sus células huéspedes para ser útiles en, por ejemplo, la generación de anticuerpos, la secuenciación, o la producción de preparaciones farmacéuticas. Mediante técnicas bien conocidas en la materia, los polipéptidos sustancialmente puros se pueden producir a la luz de las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos descritas en el presente documento. Debido a que un polipéptido sustancialmente purificado de la invención se puede mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el polipéptido puede comprender solo un cierto porcentaje en peso de la preparación. No obstante, el polipéptido es sustancialmente puro, en cuanto a que se ha separado sustancialmente de las sustancias con las que puede estar asociado en los sistemas vivos.

Como se usa en el presente documento con respecto a los ácidos nucleicos, el término “aislado” significa: (i) amplificado *in vitro* mediante, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producido recombinantemente mediante clonación; (iii) purificado, mediante escisión o separación en gel; o (iv) sintetizado, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es aquel que es fácilmente manipulable mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia. De este modo, una secuencia nucleotídica contenida en un vector en el que se conocen los sitios de restricción de 5' y 3', o para el que se han divulgado las secuencias de los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se considera aislada, pero una secuencia de ácidos nucleicos que existe en su estado nativo en su huésped natural no lo está. Un ácido nucleico aislado puede estar sustancialmente purificado, pero no necesita estarlo. Por ejemplo, un ácido nucleico que está aislado dentro de un vector de clonación o de expresión no es puro en cuanto a que puede comprender solo un pequeño porcentaje del material en la célula en la que reside. Sin embargo, tal ácido nucleico está aislado, ya que el término se usa en el presente documento debido a que es fácilmente manipulable mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia.

Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia de codificación y las secuencias reguladoras están “unidas operablemente” cuando están enlazadas covalentemente de tal manera que se coloca la expresión o transfección de la secuencia de codificación bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias de codificación sean traducidas en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas operablemente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras de 5' da como resultado la transcripción de la secuencia de codificación y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación de desplazamiento del marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de las secuencias de codificación, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente para ser traducido en una proteína. De este modo, una región promotora estaría unida operablemente a una secuencia de codificación si la región promotora fuese capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de tal manera que el transcrito resultante puede ser traducido en la proteína o polipéptido deseado.

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies o tipos celulares, pero en general debe incluir, según sea necesario, las secuencias que no se transcriben en 5' y las secuencias que no se traducen en 5' implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción respectivamente, tales como una caja TATA, una secuencia de protección, una secuencia CAAT. Especialmente, tales secuencias reguladoras que no se transcriben en 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del gen unido operablemente. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en dirección 5', según se desee.

Como se usa en el presente documento, un “vector” puede ser cualquiera de un número de ácidos nucleicos en el que se puede insertar una secuencia deseada mediante restricción y ligación para transporte entre diferentes entornos genéticos o para la expresión en una célula huésped. Los vectores están compuestos típicamente por ADN, aunque también existen vectores de ARN. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es aquel que es capaz de replicarse en una célula huésped y que se caracteriza además por uno o más sitios de restricción de endonucleasas, en los que el vector se puede cortar de una manera determinable, y en los que se puede ligar una secuencia de ADN deseada de tal manera que el nuevo vector recombinante retiene su capacidad para replicarse en la célula huésped. En el caso de plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede producirse muchas veces a medida que el aumenta el número de copias del plásmido dentro de la bacteria huésped o solo una única vez por huésped antes de que el huésped se reproduzca por mitosis. En el caso del fago, la replicación se puede producir activamente durante una fase lítica o pasivamente durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es aquel en el que se puede insertar una secuencia de ADN deseada mediante restricción y ligación, de manera que está unida operablemente a secuencias reguladoras y se puede expresar como un transcrito de ARN. Los vectores pueden contener además una o más secuencias marcadoras adecuadas para su uso en la identificación y la selección de células que se han transformado o transfectado con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas e incrementan o disminuyen la resistencia o sensibilidad a los antibióticos o a otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades son detectables mediante ensayos estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, β -galactosidasa o fosfatasa alcalina) y genes que afectan visiblemente al fenotipo de las células, huéspedes, colonias o placas transformados o transfectados. Los vectores preferidos son aquellos capaces de realizar una replicación y una expresión autónomas de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los que están unidos operablemente.

Nuevos anticuerpos monoclonales anti-glucoproteína G de HeV y de NiV

La presente invención deriva, en parte, del aislamiento y la caracterización de nuevos anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen selectivamente a los virus Hendra y Nipah y los neutralizan. Como se describe de forma más completa más adelante, se ha demostrado que estos anticuerpos monoclonales se unen a la glucoproteína G y neutralizan los virus Hendra y Nipah. El paratopo de los fragmentos Fab anti-HeV y NiV asociados con el epítipo de neutralización en la glucoproteína G de HeV y NiV se define mediante las secuencias de aminoácidos (aa) de las regiones V de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina descritas en las Tablas A y B y en la SEC ID N° 1 a la SEC ID N°: 416.

En un conjunto de formas de realización, la presente invención proporciona los anticuerpos monoclonales completamente humanos y de longitud completa frente a Hendra y Nipah, en forma aislada y en preparaciones farmacéuticas. De forma similar, como se describe más adelante, la presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados, células huéspedes transformadas con ácidos nucleicos y preparaciones farmacéuticas, incluidos ácidos nucleicos aislados, que codifican los anticuerpos monoclonales completamente humanos y de longitud completa frente a Hendra y Nipah. Por último, la presente invención proporciona métodos, como se describe de forma más completa más adelante, que emplean estos anticuerpos en el diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, la prevención y el tratamiento de la enfermedad por el virus Hendra o de la enfermedad por el virus Nipah.

De forma significativa, como es bien conocido en la técnica, solo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véanse, en general, Clark, W.R. 1986 en *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. 1991 en *Essential Immunology*, 7ª Ed., Blackwell Scientific-Publications, Oxford). Por ejemplo, las regiones pFc' y Fc son efectoras de la cascada del complemento, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región pFc' o que se ha producido sin la región pFc', denominado un fragmento F(ab')₂ retiene ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo de longitud completa. De un modo similar, un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región Fc o que se ha producido sin la región Fc, denominado un fragmento Fab retiene ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo de longitud completa. Continuando más allá, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unida covalentemente y una porción de la cadena pesada del anticuerpo denominada Fd. Los fragmentos Fd son el determinante principal de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd puede estar asociado con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd retienen la capacidad de unión al epítipo en aislamiento.

Dentro de la porción de un anticuerpo que se une al antígeno, como es bien conocido en la técnica, hay regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que interaccionan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones de armazón estructural (FR), que mantienen la estructura terciaria del paratopo (véanse, en general, Clark, 1986, citado anteriormente; Roitt, 1991, citado anteriormente). En el fragmento Fd tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de las inmunoglobulinas IgG hay cuatro regiones de armazón estructural (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente la CDR3 de cadena pesada, son principalmente responsables de la especificidad del anticuerpo.

En el presente documento se divulgan las secuencias de aminoácidos completas de las porciones Fab de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah, así como las regiones FR y CDR relevantes. Las SEC ID N° 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 321, 337, 353, 369, 385 y 401 divulgan las secuencias de aminoácidos del fragmento Fd de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah. Las secuencias de aminoácidos de las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 de la cadena pesada se divulgan como (FR1, SEC ID N° 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, y 402); (CDR1, SEC ID N° 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291, 307, 323, 339, 355, 371, 387, y 403); (FR2, SEC ID N° 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, y 404); (CDR2, SEC ID N° 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293, 309, 325, 341, 357, 373, 389, y 405); (FR3, SEC ID N° 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, y 406); (CDR3, SEC ID N° 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295, 311, 327, 343, 359, 375, 391, y 407); y (FR4, SEC ID N° 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392 y 408). Las SEQ ID N°: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 329, 345, 361, 377, 393 y 409 divulgan las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah. Las secuencias de aminoácidos de las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 de la cadena ligera se divulgan como (FR1, SEC ID N° 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, y 410); (CDR1, SEC ID N° 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299, 315, 331, 347, 363, 379, 395, y 411); (FR2, SEC ID N° 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, y 412); (CDR2, SEC ID N° 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301, 317, 333, 349, 365, 381, 397, y 413); (FR3, SEC ID N° 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, y 414); (CDR3, SEC ID N° 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303, 319, 335, 351, 367, 383, 399, y 415); (FR4, SEC ID N° 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400 y 416).

Ahora está bien establecido en la técnica que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero se pueden sustituir por regiones similares de anticuerpos conespecíficos o heteroespecíficos, al tiempo que retienen la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados", en los que las CDR no humanas se unen covalentemente a las regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional. De este modo, por ejemplo, la publicación internacional PCT

número WO 92/04381 enseña la producción y uso de anticuerpos anti-RSV murinos humanizados, en los que al menos una porción de las regiones FR murinas han sido sustituidas por regiones FR de origen humano. Tales anticuerpos, incluyendo los fragmentos de anticuerpos de longitud completa con capacidad para unirse al antígeno, se denominan a menudo anticuerpos "quiméricos".

De este modo, como se pondrá de manifiesto para el experto en la materia, en el presente documento se describen fragmentos $F(ab')_2$, Fab, Fv y Fd de anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc, y/o FR, y/o CDR1, y/o CDR2, y/o CDR3 de la cadena ligera de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos de fragmentos $F(ab')_2$ quiméricos en los que las regiones FR, y/o CDR1, y/o CDR2, y/o CDR3 de la cadena ligera, de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos de fragmentos Fab quiméricos en los que las regiones FR, y/o CDR1, y/o CDR2, y/o CDR3 de la cadena ligera se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas; y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas. De este modo, los expertos en la materia pueden alterar los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah mediante la construcción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos quiméricos o injertados con CDR que contienen todas, o parte, de las secuencias de aminoácidos de CDR de la región V de las cadenas pesada y ligera divulgadas (Jones, P.T. et al. 1986 *Nature* 321:522-525; Verhoeven, M. et al. 1988 *Science* 39:1534-1536; y Tempest, P.R. et al. 1991 *Biotechnology* 9:266-271), sin destruir la especificidad de los anticuerpos por el epítipo de la glucoproteína G. Tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpos quiméricos o injertados con CDR pueden ser eficaces en la prevención y tratamiento de la infección por los virus Hendra o Nipah en animales (por ejemplo, caballos) y en el ser humano.

En formas de realización preferidas, los anticuerpos quiméricos de la invención son anticuerpos monoclonales completamente humanos que incluyen al menos la región CDR3 de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah. Como se señala anteriormente, se pueden producir tales anticuerpos quiméricos en los que algunas o todas las regiones FR de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah se han sustituido por otras regiones FR humanas homólogas. Además, las porciones Fc se pueden sustituir a fin de producir anticuerpos IgA o IgM, así como IgG, que poseen algunas o todas las CDR de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah. De particular importancia es la inclusión de la región CDR3 de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah, y, en menor grado, las otras CDR de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah. Tales anticuerpos completamente humanos o quiméricos tendrán utilidad particular en cuanto a que no provocan una respuesta inmunitaria frente al propio anticuerpo.

También es posible, como se describe en el presente documento, producir anticuerpos quiméricos que incluyen secuencias no humanas. De este modo, se pueden usar, por ejemplo, secuencias Fc o FR murinas, ovinas, equinas, bovinas, o de otros mamíferos, para sustituir algunas o todas las regiones Fc o FR de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah. Asimismo, se pueden sustituir algunas de las CDR. De nuevo, sin embargo, se prefiere que al menos la CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah se incluyan en tales anticuerpos quiméricos, y, en menor medida, también se prefiere incluir algunas o todas las demás CDR de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah. Tales anticuerpos quiméricos portadores de secuencias de inmunoglobulinas no humanas mezcladas con las CDR de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah no son preferidos para su uso en seres humanos, y particularmente no se prefieren para un uso amplio debido a que pueden provocar una respuesta inmunitaria frente a las secuencias no humanas. Por supuesto, se pueden usar durante breves períodos o en individuos inmunodeprimidos, pero, de nuevo, se prefieren los anticuerpos monoclonales completamente humanos. Sin embargo, debido a que los virus Hendra y Nipah también infectan a animales, y debido a que tales anticuerpos se pueden usar durante breves períodos o en sujetos inmunodeprimidos, en el presente documento se describen los anticuerpos quiméricos que poseen secuencias de Fc y FR de mamíferos no humanos, pero que incluyen al menos la CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah.

Para usos profilácticos o de inoculación, los anticuerpos de la presente invención son preferentemente moléculas de anticuerpos de longitud completa que incluyen la región Fc. Tales anticuerpos de longitud completa tendrán semividas más largas que los anticuerpos de fragmentos más pequeños (por ejemplo, Fab) y son más adecuados para la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcutánea, o transdérmica.

En algunas formas de realización, se prefieren fragmentos Fab, incluyendo fragmentos Fab quiméricos. Los Fab ofrecen varias ventajas con respecto a $F(ab')_2$ y moléculas de inmunoglobulina completas para esta modalidad terapéutica. En primer lugar, debido a que los Fab tienen solo un sitio de unión para su antígeno afín, se evita la formación de complejos inmunitarios, mientras que tales complejos se pueden generar cuando los $F(ab')_2$ bivalentes y las moléculas de inmunoglobulina completas encuentran su antígeno diana. Esto es de suma importancia debido a que la deposición de complejos inmunitarios en los tejidos puede producir reacciones inflamatorias adversas. En segundo lugar, debido a que los Fab carecen de una región Fc, no pueden desencadenar reacciones inflamatorias adversas activadas por Fc, tales como la activación de la cascada del complemento. En tercer lugar, es probable que la penetración en los tejidos de la molécula pequeña Fab sea mucho mejor que la del anticuerpo completo más grande. En cuarto lugar, los Fab se pueden producir fácilmente y de forma barata en bacterias, tales como *E. coli*,

mientras que las moléculas de anticuerpos de tipo inmunoglobulina completos requieren células de mamíferos para su producción en cantidades útiles. Esto último supone la transfección de secuencias de inmunoglobulina en células de mamíferos, con la transformación resultante. Después, la amplificación de estas secuencias se debe lograr mediante procedimientos selectivos rigurosos y los transformantes estables se deben identificar y mantener. Las

5 moléculas de inmunoglobulina completas se deben de producir en células de mamíferos de alta expresión transformadas de forma estable en cultivo, con los problemas concomitantes del medio de cultivo que contiene suero. Por el contrario, la producción de los Fab en *E. coli* elimina estas dificultades y hace posible producir estos fragmentos de anticuerpos en grandes fermentadores, que son más baratos que los productos derivados del cultivo.

10 Además de los Fab, también se contemplan en la presente invención fragmentos de anticuerpos más pequeños y péptidos de unión al epítipo que tienen una especificidad de unión por los epítopos definidos por los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah, y también se pueden usar para unirse al virus o neutralizarlo. Por ejemplo, los anticuerpos monocatenarios se pueden construir de acuerdo con método de la patente de EE.UU. nº 4.946.778, de Ladner et al. Los anticuerpos monocatenarios comprenden las regiones variables de las cadenas ligera y pesada,

15 unidas mediante un resto enlazador flexible. Aún más pequeño es el fragmento de anticuerpo conocido como el anticuerpo de un solo dominio o Fd, que comprende un dominio único de V_H aislado. Las técnicas para obtener un anticuerpo de un solo dominio con al menos algo de la especificidad de unión del anticuerpo de longitud completa del que deriva se conocen en la materia.

20 Es posible determinar, sin experimentación innecesaria, si un anticuerpo alterado o quimérico tiene la misma especificidad que los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah averiguando si el primero bloquea a estos últimos en la unión a glucoproteína G. Si el anticuerpo monoclonal que se está analizando compite con el anticuerpo monoclonal frente a Hendra o Nipah según se muestra mediante una disminución en la unión del anticuerpo monoclonal frente a Hendra o Nipah, es probable que los dos anticuerpos monoclonales se unan al mismo epítipo,

25 o a un epítipo situado muy próximo. Todavía otra manera para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah es preincubar el anticuerpo monoclonal frente a Hendra o Nipah con la glucoproteína G con la que normalmente es reactivo y después añadir el anticuerpo monoclonal que se está analizando, para determinar si se inhibe la capacidad para unirse a la glucoproteína G del anticuerpo monoclonal que se está analizado. Si el anticuerpo monoclonal que se está analizando es inhibido, con

30 toda probabilidad tiene el mismo epítipo y especificidad, o un equivalente funcionalmente, que los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah de la invención. La detección selectiva de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah también se puede llevar a cabo utilizando los virus Hendra o Nipah, y determinando si el mAb neutraliza los virus.

35 Usando los anticuerpos de la invención, ahora es posible producir anticuerpos antiidiotípicos que se pueden usar para identificar otros anticuerpos monoclonales para saber si el anticuerpo tiene la misma especificidad de unión que un anticuerpo de la invención. Además, tales anticuerpos antiidiotípicos se pueden usar para la inmunización activa (Herlyn, D. et al. 1986 Science 2,32:100-102). Tales anticuerpos antiidiotípicos se pueden producir usando técnicas de hibridomas bien conocidas (Kohler, G. y Milstein, C. 1975 Nature 256:495-497). Un anticuerpo antiidiotípico es un

40 anticuerpo que reconoce determinantes únicos presentes en el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de interés. Estos determinantes están situados en la región hipervariable del anticuerpo. Es esta región la que se une a un epítipo dado y, de este modo, es responsable de la especificidad del anticuerpo. Un anticuerpo antiidiotípico se puede preparar inmunizando a un animal con el anticuerpo monoclonal de interés. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un

45 anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos. Usando los anticuerpos antiidiotípicos del animal inmunizado, que son específicos de los anticuerpos monoclonales de la invención, es posible identificar otros clones con el mismo idiotipo que el anticuerpo del hibridoma usado para la inmunización. La identidad idiotípica entre anticuerpos monoclonales de dos líneas celulares demuestra que los dos anticuerpos monoclonales son los mismos con respecto a su reconocimiento del mismo determinante epitópico. De este modo, usando anticuerpos antiidiotípicos

50 es posible identificar otros hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales que tienen la misma especificidad epitópica.

También es posible usar la tecnología de antiidiotipos para producir anticuerpos monoclonales que imitan a un epítipo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal antiidiotípico obtenido frente a un primer anticuerpo monoclonal

55 tendrá un dominio de unión en la región hipervariable que es la imagen del epítipo unido por el primer anticuerpo monoclonal. De este modo, el anticuerpo monoclonal antiidiotípico se puede usar para la inmunización, puesto que el dominio de unión del anticuerpo monoclonal antiidiotípico actúa eficazmente como un antígeno.

Ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-glucoproteína G de HeV y NiV

60 Dada la presente divulgación de las secuencias de aminoácidos de los dominios Fd de la cadena pesada y variable de la cadena ligera de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah, el experto en la materia es ahora capaz de producir ácidos nucleicos que codifican este anticuerpo o que codifican los diversos fragmentos de anticuerpos o anticuerpos quiméricos descritos anteriormente. Se contempla que tales ácidos nucleicos estarán

65 unidos operablemente a otros ácidos nucleicos que forman un vector recombinante para la clonación o para la expresión de los anticuerpos de la invención. La presente invención incluye cualquier vector recombinante que

contenga las secuencias de codificación, o parte de ellas, ya sea para la transformación, transfección procariotas o eucariotas, o para la terapia génica. Tales vectores se pueden preparar usando técnicas de biología molecular convencionales, conocidas por los expertos en la materia, y comprenderían secuencias de codificación de ADN para las regiones V de inmunoglobulina de los anticuerpos monoclonales frente a Hendra y Nipah, incluyendo el armazón estructural y las CDR o sus partes, y un promotor adecuado con (Whittle, N. et al. 1987 Protein Eng 1:499-505 y Burton, D.R. et al. 1994 Science 266:1024-1027) o sin (Marasco, W.A. et al, 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90:7889-7893 y Duan, L. et al 1994 Proc Natl Acad Sci USA 91:5075-5079) una secuencia señal para la exportación o secreción. Tales vectores se pueden transformar o transfectar en células procariotas (Huse, W.D. et al. 1989 Science 246:12755-1281; Ward, S. et al. 1989 Nature 341:544-546; Marks, J.D. et al. 1991 J Mol Biol 222:581-597; y Barbas, C.F. et al. 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:7978-7982) o eucariotas (Whittle, N. et al. 1987 Protein Eng 1:499-505 y Burton, D.R. et al. 1994 Science 266:1024-1027) o se pueden usar para terapia génica (Marasco, W.A. et al. 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90:7889-7893 y Duan, L. et al. 1994 Proc Natl Acad Sci USA 91:5075-5079) mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

Los vectores de expresión de la presente invención incluyen secuencias reguladoras unidas operablemente a una secuencia nucleotídica que codifica uno de los anticuerpos de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias reguladoras" significa secuencias nucleotídicas que son necesarias para, o que conducen a, la transcripción de una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido deseado, y/o que son necesarias para, o que conducen a, la traducción del transcrito resultante en el péptido deseado. Las secuencias reguladoras incluyen, pero no se limitan a, secuencias en 5', tales como operadores, promotores y secuencias de unión al ribosoma, y secuencias en 3', tales como señales de poliadenilación. Los vectores de la invención pueden incluir opcionalmente secuencias líder o señal en 5', secuencias en 5' o 3' que codifican productos de fusión para ayudar a la purificación de proteínas y diversos marcadores que ayudan a identificar o seleccionar los transformantes. La elección y diseño de un vector apropiado está dentro de la capacidad y discreción de un experto en la materia. La purificación posterior de los anticuerpos se puede lograr mediante cualquiera de diversos medios estándar conocidos en la técnica.

Un vector preferido para identificar anticuerpos monoclonales, pero no necesariamente preferido para la producción en masa de los anticuerpos de la invención, es una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia nucleotídica que codifica y que es capaz de expresar un polipéptido de fusión que contiene, en la dirección desde el extremo amino al extremo carboxi, (1) un dominio de señal de la secreción procariota, (2) un polipéptido de la invención, y, opcionalmente, (3) un dominio de proteína de fusión. El vector incluye secuencias reguladoras de ADN para expresar el polipéptido de fusión, preferentemente secuencias reguladoras procariotas. Los expertos en la materia pueden construir dichos vectores y se han descrito en Smith, G.P et al. (1985 Science 228:13151317); Clackson, T. et al. (1991 Nature 352:624-628); Kang et al (1991 en Methods: A Companion to Methods in Enzymology, vol. 2, R. A. Lerner y D.R. Burton, ed. Academic Press, NY, págs. 111-118); Barbas, C.F. et al. (1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:7978-7982); Roberts, B. L. et al. (1992 Proc Natl Acad Sci USA 89:2429-2433).

Un polipéptido de fusión puede ser útil para la purificación de los anticuerpos de la invención. El dominio de fusión puede incluir, por ejemplo, una cola de poli-His que permite la purificación en columnas de Ni²⁺ o la proteína de unión a maltosa del vector pMAL disponible comercialmente (New England BioLabs, Beverly, MA). Un dominio de fusión actualmente preferido, pero de ningún modo necesario, es un anclaje de membrana de fago filamentoso. Este dominio es particularmente útil para identificar bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos monoclonales, pero puede ser de menor utilidad para la producción en masa de anticuerpos. El anclaje de membrana de fago filamentoso es, preferentemente, un dominio de la proteína de recubrimiento cpIII o cpVIII capaz de asociarse con la matriz de una partícula de fago filamentoso, de modo que incorpora el polipéptido de fusión sobre la superficie del fago, para permitir la unión en fase sólida a antígenos o epítopos específicos y permitir, de ese modo, el enriquecimiento y la selección de los anticuerpos o fragmentos específicos codificados por el vector fagémido.

La señal de secreción es un dominio de péptido líder de una proteína que dirige la proteína hacia la membrana de la célula huésped, tal como la membrana periplásmica de bacterias gramnegativas. Una señal de secreción preferida para *E. coli* es una señal de secreción de pelB. La secuencia líder de la proteína pelB se ha usado previamente como una señal de secreción para proteínas de fusión (Better, M. et al. 1988 Science 240:1041-1043; Sastry, L. et al. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:5728-5732; y Mullinax, R.L. et al., 1990 Proc Natl Acad Sci USA 87:8095-8099). Se pueden encontrar secuencias de restos de aminoácidos para otros dominios polipeptídicos de señales de secreción procedentes de *E. coli* útiles en la presente invención en Neidhard, F.C. (ed), 1987 en *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Typhimurium Cellular and Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Para lograr niveles elevados de expresión génica en *E. coli* es necesario usar no solo promotores potentes para generar grandes cantidades de ARNm, sino también sitios de unión al ribosoma, para asegurarse de que el ARNm se traduce eficientemente. En *E. coli*, el sitio de unión al ribosoma incluye un codón de iniciación (AUG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud situada 3-11 nucleótidos en dirección 5' del codón de iniciación (Shine J. y Dalgarno L. 1975 Nature 254:34-38). La secuencia, que se denomina secuencia de Shine-Dalgarno (SD) es complementaria del extremo 3' del ARNr 16S de *E. coli*. La unión del ribosoma al ARNm y a la secuencia en el extremo 3' del ARNm se puede ver afectada por varios factores: el grado de complementariedad entre la secuencia

de SD y el extremo 3' del ARNr 16S; el espaciado que existe entre la secuencia de SD y el AUG; y la secuencia nucleotídica después del AUG, que afecta a la unión del ribosoma. Las secuencias reguladoras de 3' definen al menos un codón de terminación (parada) en marco con y unido operablemente al polipéptido de fusión heterólogo.

- 5 En formas de realización preferidas con un huésped de expresión procariota, el vector utilizado incluye un origen de replicación o replicón procariota, es decir, una secuencia de ADN que tiene la capacidad para dirigir la replicación autónoma y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante extracromosómicamente en una célula huésped procariota, tal como una célula huésped bacteriana, transformada con ella. Tales orígenes de replicación son bien conocidos en la técnica. Los orígenes de replicación preferidos son aquellos que son eficientes en el organismo huésped. Una célula huésped preferida es *E. coli*. Para uso de un vector en *E. coli*, un origen de replicación preferido es ColEI, encontrado en pBR322 y otros diversos plásmidos habituales. También se prefiere el origen de replicación p15A, encontrado en pACYC y sus derivados. Los replicones ColEI y p15A se han utilizado ampliamente en biología molecular, están disponibles en diversos plásmidos, y están descritos por Sambrook et al., 1989, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 15 Además, las formas de realización que incluyen un replicón procariota también incluyen preferentemente un gen cuya expresión confiere una ventaja selectiva, tal como resistencia a fármacos, a un huésped bacteriano transformado con él. Los genes bacterianos de resistencia a fármacos típicos son aquellos que confieren resistencia a ampicilina, tetraciclina, neomicina/kanamicina o cloranfenicol. Los vectores también contienen típicamente sitios de restricción convenientes para la inserción de secuencias de ADN traducibles. Los ejemplos de vectores son los plásmidos pUC18 y pUC19 y vectores derivados, tales como aquellos comercialmente disponibles de proveedores tales como Invitrogen (San Diego, CA).

- 25 Cuando los anticuerpos como se describen en el presente documento incluyen secuencias tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera, estas secuencias se pueden codificar en vectores separados, o, de forma más conveniente, pueden estar expresadas por un único vector. Las cadenas pesada y ligera pueden formar, después de la traducción o después de la secreción, la estructura heterodimérica de las moléculas de anticuerpos naturales. Tal anticuerpo heterodímero puede estar estabilizado o no por enlaces disulfuro entre las cadenas pesada y ligera.

- 30 Un vector para la expresión de anticuerpos heterodímeros, tal como los anticuerpos de longitud completa de la invención, o los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂, Fab o Fv de la invención, es una molécula de ADN recombinante adaptada para recibir y expresar la primera y la segunda secuencias de ADN traducibles. Es decir, un vector de expresión de ADN para expresar un anticuerpo heterodímero proporciona un sistema para clonar (insertar) independientemente las dos secuencias de ADN traducibles en dos casetes separados presentes en el vector, para formar dos cistrones separados para expresar los polipéptidos primero y segundo de un anticuerpo heterodimérico. El vector de expresión de ADN para expresar dos cistrones se denomina vector de expresión dicistrónico.

- 40 Preferentemente, el vector comprende un primer casete que incluye en dirección 5' y en dirección 3' secuencias reguladoras de ADN unidas operablemente a través de una secuencia de nucleótidos adaptada para la ligación direccional en un ADN de inserto. La secuencia traducible en dirección 5' codifica preferentemente la señal de secreción como se ha descrito en lo que antecede. El casete incluye secuencias reguladoras de ADN para expresar el primer polipéptido del anticuerpo que se produce cuando una secuencia de ADN traducible de inserto (ADN de inserto) se inserta direccionalmente en el casete a través de la secuencia de nucleótidos adaptada para la ligación direccional.

- 45 El vector de expresión dicistrónico también contiene un segundo casete para expresar el segundo polipéptido del anticuerpo. El segundo casete incluye una segunda secuencia de ADN traducible que codifica preferentemente una señal de secreción, como se ha descrito anteriormente, unida operablemente en su término 3' a través de una secuencia de nucleótidos adaptada para la ligación direccional a una secuencia de ADN en dirección 3' del vector que define típicamente al menos un codón de terminación en el marco de lectura del casete. La segunda secuencia de ADN traducible está unida operablemente en su extremo 5' a secuencias reguladoras de ADN que forman los elementos de 5'. El segundo casete es capaz, con la inserción de una secuencia de ADN traducible (ADN de inserto), de expresar el segundo polipéptido de fusión que comprende una señal de secreción con un polipéptido codificado por el ADN de inserto.

- 50 Por supuesto, los anticuerpos de la presente invención se pueden producir adicionalmente en células eucariotas, tales como células CHO, hibridomas humanos o de ratón, células linfoblastoides B inmortalizadas. En este caso, se construye un vector en el que las secuencias reguladoras eucariotas están unidas operablemente a las secuencias nucleotídicas que codifican el polipéptido o polipéptidos del anticuerpo. El diseño y selección de un vector eucariota apropiado está dentro de la capacidad y discreción de un experto en la materia. La purificación posterior de los anticuerpos se puede lograr mediante cualquiera de diversos medios estándar conocidos en la técnica.

- 60 Por supuesto, los anticuerpos de la presente invención pueden producirse además en plantas. En 1989, Hiatt A. et al. 1989 Nature 342:76-78 demostraron por primera vez que se podían producir anticuerpos funcionales en plantas transgénicas. Desde entonces, se ha invertido una cantidad considerable de esfuerzo en desarrollar plantas para la producción de anticuerpos (o "planticuerpos") (véanse revisiones en Giddings, G. et al. 2000 Nat Biotechnol 18:1151-

1155; Fischer, R. y Emans, N. 2000 Transgenic Res 9:279-299). Los anticuerpos recombinantes pueden dirigirse a semillas, tubérculos o frutas, lo que la administración de anticuerpos en tales tejidos vegetales sea ventajosa para programas de inmunización en países en desarrollo y a nivel mundial.

- 5 En otra forma de realización, la presente invención proporciona células huéspedes, tanto procariotas como eucariotas, transformadas o transfectadas con, y por lo tanto que incluyen, los vectores de la presente invención. Diagnóstico y preparaciones farmacéuticas de anticuerpos frente a la glucoproteína G de HeV y NiV

Preparaciones

- 10 En el presente documento se describe un método para preparar composiciones de diagnóstico o farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales de la invención o secuencias polinucleotídicas que codifican los anticuerpos de la invención o partes de los mismos, usándose las composiciones farmacéuticas para inmunopprofilaxis o inmunoterapia de la enfermedad del virus Hendra o de la enfermedad del virus Nipah. La
15 preparación farmacéutica incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos, como se usan en el presente documento, significan un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. La expresión "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. Los vehículos fisiológica y farmacéuticamente aceptables incluyen
20 diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, y otros materiales que son bien conocidos en la técnica.

- En el presente documento se describen anticuerpos monoclonales cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 7 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la
25 SEC ID Nº 15; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 23 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 31; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 39 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 47; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la
30 SEC ID Nº 55 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 63; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 71 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 79; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 87 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la
35 SEC ID Nº 95; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 103 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 111; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 119 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 127; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la
40 SEC ID Nº 135 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 143; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 151 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 159; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 167 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la
45 SEC ID Nº 175; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 183 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 191; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 199 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 207; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la
50 SEC ID Nº 215 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 223; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 231 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 239; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 247 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la
55 SEC ID Nº 255; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 263 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 271; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 279 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 287; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 295 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 303; cuyas
60 cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 311 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR2 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 319; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 327 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 335; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 343 y/o cuyas
65 cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 351; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 359 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 367; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 375 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 383; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 391 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 399; cuyas cadenas pesadas comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 407 y/o cuyas cadenas ligeras comprenden en CDR3 el polipéptido que tiene la SEC ID Nº 415; y variaciones conservadoras de estos péptidos. La expresión "variación conservativa" como se usa en el presente documento representa la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar.

Ejemplos de variaciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro o la sustitución de un residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina. La expresión "variación conservadora" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido siempre que los anticuerpos que

tengan el polipéptido sustituido también se unan a los virus Hendra o Nipah o los neutralicen. Análogamente, otra

realización preferida de la invención se refiere a polinucleótidos que codifican los polipéptidos de cadena pesada

señalados anteriormente y a secuencias polinucleotídicas que son complementarias de estas secuencias

polinucleotídicas. Las secuencias polinucleotídicas complementarias incluyen aquellas secuencias que se hibridan

con las secuencias polinucleotídicas de la invención en condiciones de hibridación restrictivas.

Los anticuerpos anti-Hendra y Nipah de la invención se pueden marcar mediante diversos medios para su uso en

aplicaciones de diagnóstico y/o farmacéuticas. Existen muchos marcadores y procedimientos de marcaje diferentes

conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de los tipos de marcadores que se pueden usar en la presente

invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos

quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los expertos en la materia conocerán otros marcadores

adecuados para la unión a los anticuerpos monoclonales de la invención, o serán capaces de determinarlos usando

experimentación normal. Además, la unión de estos marcadores a los anticuerpos monoclonales de la invención se

puede realizar usando técnicas estándar, habituales para los expertos en la materia.

Otra técnica de marcaje que puede dar como resultado una mayor sensibilidad consiste en acoplar los anticuerpos a

haptenos de peso molecular bajo. Estos haptenos se pueden alterar después específicamente por medio de una

segunda reacción. Por ejemplo, es habitual usar haptenos, tales como biotina, que reacciona con avidina, o

dinitrofenol, piridoxal, o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos específicos anti-haptenos.

Los materiales para su uso en el ensayo descrito en el presente documento son idealmente adecuados para la

preparación de un kit. Tal kit puede comprender un vehículo que se compartimentaliza para recibir en estrecho

confinamiento uno o más recipientes, tales como viales, tubos, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de

los elementos separados que se van a usar en el método. Por ejemplo, uno de los recipientes puede comprender

un anticuerpo monoclonal de la invención que está, o puede estar, marcado de forma detectable. El kit también puede

tener recipientes que contienen uno o más tampones, y/o un recipiente que comprende un medio indicador, tal como

una proteína de unión a biotina, tal como avidina o estreptavidina, unida a una molécula indicadora, tal como un

marcador enzimático o fluorescente.

Detección y diagnóstico *in vitro*

Los anticuerpos monoclonales de la invención son adecuados para su uso *in vitro* en, por ejemplo, inmunoensayos

en los que se pueden usar en fase líquida o unidos a un vehículo en fase sólida. Además, los anticuerpos

monoclonales en estos inmunoensayos se pueden marcar de forma detectable de diversas maneras. Los ejemplos

de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar los anticuerpos monoclonales de la invención son inmunoensayos

competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Los ejemplos de tales inmunoensayos son el

radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo (inmunométrico) de tipo sándwich. La detección de antígenos usando los

anticuerpos monoclonales de la invención se puede realizar utilizando inmunoensayos que se llevan a cabo de las

formas directa, inversa o simultánea, incluyendo ensayos inmunohistoquímicos sobre muestras fisiológicas. Los

expertos en la materia conocerán, o pueden discernir fácilmente, otros formatos de inmunoensayos sin

experimentación excesiva.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden unir a muchos vehículos diferentes y se pueden usar para

detectar la presencia de los virus Hendra o Nipah. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio,

poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasa, celulosa natural y modificada, poliácridamida,

agarosa y magnetita. Para los fines de la invención, la naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble. Los

expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para unir anticuerpos monoclonales o serán capaces

de averiguarlos usando experimentación habitual.

Para los fines de la invención, los virus Hendra o Nipah se pueden detectar mediante los anticuerpos monoclonales

de la invención cuando están presentes en fluidos biológicos y tejidos. Se puede usar cualquier muestra que

contenga una cantidad detectable de virus Hendra o Nipah. Una muestra puede ser un líquido, tal como orina, saliva,

líquido cefalorraquídeo, sangre, suero, o similar; un sólido o semisólido, tal como tejidos, heces, o similares; o, como

alternativa, un tejido sólido, tales como los usados habitualmente en el diagnóstico histológico.

Detección *in vivo* de los virus Hendra o Nipah

Al usar los anticuerpos monoclonales de la invención para la detección *in vivo* de antígeno, el anticuerpo monoclonal

marcado detectablemente se da en una dosis que es eficaz desde el punto de vista del diagnóstico. La expresión

"eficaz desde el punto de vista del diagnóstico" significa que la cantidad de anticuerpo monoclonal marcado

detectablemente se administra en una cantidad suficiente para permitir la detección del sitio que tiene el antígeno del

virus Hendra o Nipah para el cual son específicos los anticuerpos monoclonales.

La concentración de anticuerpo monoclonal marcado detectablemente que se administra debería de ser suficiente de manera que la unión al virus Hendra o Nipah sea detectable en comparación con el valor básico. Además, es deseable que el anticuerpo monoclonal marcado detectablemente se aclare rápidamente del sistema circulatorio a fin de dar la mejor relación de señal diana – fondo.

Como regla, la dosificación del anticuerpo monoclonal marcado detectablemente para el diagnóstico *in vivo* variará dependiendo de factores tales como la edad, el sexo, y el grado de enfermedad del individuo. La dosis de anticuerpo monoclonal puede variar desde aproximadamente 0, 01 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, preferentemente de 0, 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, lo más preferentemente de aproximadamente 0, 1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg. Tales dosis pueden variar, por ejemplo, dependiendo de si se administran múltiples inyecciones, del tejido que se esté evaluando y de otros factores conocidos por los expertos en la materia.

Para la formación de imágenes de diagnóstico *in vivo*, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor importante a la hora de seleccionar un radioisótopo apropiado. El radioisótopo seleccionado debe tener un tipo de deterioro que sea detectable para el tipo dado de instrumento. Todavía otro factor importante a la hora de seleccionar un radioisótopo para el diagnóstico *in vivo* es que la semivida del radioisótopo sea suficientemente larga de manera que todavía sea detectable en el momento de máxima captación por la diana, pero lo suficientemente corto de manera que la radiación perjudicial con respecto al huésped sea aceptable. De forma ideal, un radioisótopo usado para la formación de imágenes *in vivo* carecerá de emisión de partículas, pero producirá un gran número de fotones en el intervalo de 140-250 keV, que pueden ser fácilmente detectados por las cámaras gamma convencionales.

Para el diagnóstico *in vivo*, los radioisótopos se pueden unir a las inmunoglobulinas bien directamente o indirectamente usando un grupo funcional intermedio. Los grupos funcionales intermedios que se usan a menudo para unir radioisótopos que existen como iones metálicos son los agentes quelantes bifuncionales, tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y moléculas similares. Los ejemplos típicos de iones metálicos que se pueden unir a los anticuerpos monoclonales de la invención son ¹¹¹In, ⁹⁷Ru, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁸⁹Zr y ²⁰¹Tl.

Los anticuerpos monoclonales de la invención también se pueden marcar con un isótopo paramagnético con fines de diagnóstico *in vivo*, como en la formación de imágenes por resonancia magnética (RM) o resonancia de espín electrónico (ESR). En general, se puede utilizar cualquier método convencional para visualizar las imágenes de diagnóstico. Habitualmente, los radioisótopos que emiten radiación gamma y positrones se usan para la formación de imágenes mediante cámaras y los isótopos paramagnéticos se usan para la RM. Los elementos que son particularmente útiles en tales técnicas incluyen ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁵²Cr y ⁵⁶Fe.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden usar *in vitro* e *in vivo* para monitorizar el curso de la terapia contra la enfermedad del virus Hendra o contra la enfermedad del virus Nipah. De este modo, por ejemplo, midiendo el incremento o disminución del número de células infectadas con los virus Hendra o Nipah, o los cambios en la concentración de virus Hendra o Nipah presente en el cuerpo o en diversos fluidos corporales, sería posible determinar si un régimen terapéutico particular dirigido a mejorar la enfermedad por el virus Hendra o la enfermedad por el virus Nipah es eficaz.

Profilaxis y terapia de la enfermedad por el virus Hendra y la enfermedad por el virus Nipah

Los anticuerpos monoclonales también se pueden usar en la profilaxis y como terapia para la enfermedad por el virus Hendra y la enfermedad por el virus Nipah, tanto en seres humanos como en otros animales. Los términos "profilaxis" y "terapia", como se usan en el presente documento junto con los anticuerpos monoclonales de la invención, representan la administración tanto profiláctica como terapéutica, e inmunización pasiva con productos polipeptídicos sustancialmente puros, así como terapia génica mediante transferencia de secuencias polinucleotídicas que codifican el producto o parte del mismo. De este modo, los anticuerpos monoclonales se pueden administrar a sujetos con riesgo elevado a fin de reducir la probabilidad y/o la gravedad de la enfermedad por el virus Hendra y de la enfermedad por el virus Nipah, o se pueden administrar a sujetos que ya presentan signos de infección activa por el virus Hendra o Nipah. En la presente invención, los fragmentos Fab también se unen a los virus Hendra o Nipah o los neutralizan y, por lo tanto, se pueden usar para tratar la infección, pero, por lo demás, se prefieren moléculas de anticuerpos de longitud completa.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad profilácticamente eficaz" de los anticuerpos monoclonales de la invención es una dosis suficientemente grande como para producir el efecto deseado en la protección de individuos frente a la infección por los virus Hendra o Nipah durante un período de tiempo razonable, tal como uno o dos meses o más tras la administración. Sin embargo, una cantidad profilácticamente eficaz no es una dosis tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva. Generalmente, una cantidad profilácticamente eficaz puede variar con la edad, estado y sexo del sujeto, así como con el la extensión de la enfermedad en el sujeto, y la puede determinar un experto en la técnica. La dosis de la cantidad profilácticamente eficaz la puede ajustar el médico o veterinario

individual en el caso de cualquier complicación. Una cantidad profilácticamente eficaz puede variar desde aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, lo más preferentemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, en una o más administraciones (sensibilización y refuerzo).

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los anticuerpos monoclonales de la invención es una dosis suficientemente grande para producir el efecto deseado en el que los síntomas de la enfermedad por el virus Hendra o de la enfermedad por el virus Nipah mejoran, o se reduce la probabilidad de infección. Sin embargo, una cantidad terapéuticamente eficaz no es una dosis tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad, estado y sexo del sujeto, así como con la extensión de la enfermedad en el sujeto, y la puede determinar un experto en la técnica. La dosis de la cantidad terapéuticamente eficaz la puede ajustar el médico o veterinario individual en el caso de cualquier complicación. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar desde aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, lo más preferentemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias durante uno o varios días. Se prefiere la administración del anticuerpo durante de 2 a 5 o más días consecutivos, a fin de evitar que se produzca el "rebote" de la replicación vírica.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden administrar mediante inyección o mediante infusión gradual a lo largo del tiempo. La administración de los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcutánea, o transdérmica. Las técnicas para preparar sistemas de administración inyectables o infundibles que contengan anticuerpos son bien conocidas para los expertos en la materia. Generalmente, tales sistemas deberán usar componentes que no alteren significativamente las propiedades biológicas de los anticuerpos, tal como la capacidad de unión del paratopo (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, Mack Publishing). Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y condiciones para producir preparaciones inyectables o infundibles de anticuerpos sin recurrir a experimentación innecesaria.

Para la administración parenteral, las preparaciones incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, todas incluyendo medios salinos y tamponados. Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, cloruro sódico y dextrosa, Ringer lactato o aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes.

Neutralización potente de los virus Hendra y Nipah mediante anticuerpos monoclonales humanos

Selección de los Fab (m101-7) presentados en fagos específicos de la glucoproteína G soluble (sG) del virus Hendra

Los esfuerzos iniciales de los inventores para desarrollar anticuerpos monoclonales humanos (hmAb) específicos de la glucoproteína G usando bibliotecas de anticuerpos anti-glucoproteína G y sintéticos asociadas a células, así como una biblioteca inmunitaria construida a partir de linfocitos congelados de un superviviente de la infección por Nipah, no han tenido éxito. Para desarrollar hmAb frente a la glucoproteína G de la cubierta de HeV y NiV se usó una gran biblioteca de Fab humanos sin exposición previa que contiene aproximadamente 10^{10} Fab diferentes presentados en fagos que los inventores han desarrollado recientemente. En el presente documento, los inventores usaron una forma única soluble y secretada la glucoproteína de unión (G) de HeV (sG) que los inventores han producido y caracterizado recientemente (Bossart, K. N. et al. 2005 J Virol 79:6690-6702). Esta proteína se usó como un antígeno para la detección selectiva de la biblioteca anticuerpos. Después de cuatro rondas de selección mediante conjugación, se realizó la detección selectiva de 380 clones de fagos individuales en ELISA de fagos con sG, como se describe en el Ejemplo 1. De ellos, se secuenciaron 71 clones que mostraron una unión significativa a sG. Diecisiete Fab tenían secuencias únicas (Tabla 1). Se expresaron en bacterias, se purificaron y se estudiaron para determinar la actividad de unión. Siete Fab, denominados m101 a m107, mostraron una unión significativa ($A_{450} > 0,5$) a sG en el ELISA (Tabla 1). De forma notable, de media, las CDR3 de la cadena pesada (H3) de los ligantes (m101-7) fueron significativamente más largas que las de los Fab que se unen de forma más débil (m108-17) (Tabla 1). De forma interesante, las cadenas pesadas de m101 y m102 (los neutralizantes de HeV y NiV más potentes, véase más adelante) fueron las más divergentes con respecto a las cadenas pesadas de la línea germinal, lo que indica un cierto nivel de maduración aunque son específicas de IgM. Las cadenas ligeras fueron todas de las clases Ig y muestran una mayor variación en comparación con las cadenas ligeras de la línea germinal (Tabla 2).

Inhibición de la fusión mediada por Env de HeV mediante los Fab seleccionados

Para analizar actividad neutralizante de los anticuerpos, los inventores midieron en primer lugar su capacidad para inhibir la fusión mediada por células que expresan la glucoproteína de la cubierta (Env) de HeV, con células que se habían identificado previamente como competentes para la fusión. La fusión se midió mediante dos ensayos, un ensayo de gen indicador y un ensayo de formación de sincitios. Los siete Fab que se unieron fuertemente a sG (Tabla 1) también mostraron actividad inhibidora medible en el ensayo de gen indicador (Tabla 3) y se seleccionaron para una caracterización posterior. También inhibieron la formación de sincitios hasta diversos grados, en correlación general con la actividad inhibidora medida por el ensayo de gen indicador. De forma interesante, seis de los siete Fab también inhibieron en diversos grados la fusión mediada por Env de Niv (Tabla 3). Un anticuerpo, m101, fue el más activo frente a la fusión mediada por Env de HeV, mientras que otro, m102, mostró la actividad inhibidora cruzada más elevada frente a la fusión mediada tanto por Env de HeV como Env de Niv.

Neutralización de HeV y Niv por los Fab

La actividad inhibidora de estos Fab se analizó adicionalmente usando HeV y Niv infecciosos en un ensayo de neutralización como se describe en el Ejemplo 1. Cuando se ensaya a concentraciones por encima de 80 µg/ml, el Fab m101 mostró actividad neutralizante frente a HeV, pero no frente a Niv, y el Fab m102 mostró una actividad neutralizante más débil frente a HeV en comparación con m101. De forma interesante, como en el ensayo de fusión celular, m102 mostró actividad neutralizante cruzada tanto para HeV como para Niv. Los otros Fab analizados no mostraron actividad neutralizante mensurable cuando se analizaron a concentraciones de hasta 100 µg/ml. Estos resultados indicaron que dos de los Fab seleccionados podrían neutralizar los HeV y Niv infecciosos.

Actividad inhibidora potente de IgG1 m101 frente a la fusión mediada por Env de HeV y frente al virus vivo

En la mayoría de los casos, pero no siempre, los anticuerpos completos son mejores neutralizantes que los Fab. De este modo, el Fab más potente inhibidor de la fusión mediada por HeV, m101, se convirtió a un formato de anticuerpo completo (IgG1) y se estudió en un ensayo de fusión celular. La actividad inhibidora de IgG1 m101 fue mucho mayor que la actividad del Fab m101 (Figs. 1 y 2). La conversión de Fab m101 en IgG1 disminuyó drásticamente sus CI_{50} . Para células HeLa-ATCC que muestran menores tasas de fusión, la CI_{50} disminuyó desde 4,2 µg/ml hasta 0,5 µg/ml (Figura 1A). Para las células PCI-13 altamente fusogénicas, la CI_{50} disminuyó desde 38 µg/ml hasta 1,2 µg/ml (Figura 1B). En otro experimento, el IgG1 m101 inhibió el 95 % de la fusión a 3 µg/ml. IgG1 m101 también inhibió potentemente la formación de sincitios en correlación con su actividad inhibidora medida mediante el ensayo de gen indicador. En la Figura 2 se muestra un ejemplo que usa las células PCI-13 altamente fusogénicas. Aquí, IgG1 m101 inhibió completamente la formación de sincitios a 10 µg/ml, mientras que, a la misma concentración, Fab m101 inhibió aproximadamente el 50 % de la formación de sincitios.

IgG1 m101 también fue excepcionalmente potente neutralizando el HeV infeccioso. La neutralización completa (100 %) se logró a 12,5 µg/ml, más del 99 % a 6 µg/ml y 98 % a 1,6 µg/ml (Tabla 4). Estos resultados demuestran que IgG1 m101 es un neutralizante muy potente del HeV infeccioso.

Mecanismo de inhibición de la entrada de virus por los anticuerpos: correlación con la unión a glucoproteína G nativa

Para comenzar a elucidar los mecanismos de la actividad inhibidora de los anticuerpos seleccionados se midieron sus constantes de velocidad de unión y sus afinidades por sG en un ensayo de Biacore. Los anticuerpos unidos con alta afinidad (intervalo de 1 a 10^3 nM) a sG se midieron mediante Biacore (Tabla 5). Las constantes de velocidad de asociación variaron significativamente, pero no hubo variación significativa en las constantes de velocidad de disociación, excepto la constante de velocidad de disociación muy baja de m102. Los mejores inhibidores de la fusión mediada por la glucoproteína G de HeV y de la infección, m101 y m102, mostraron la afinidad más elevada. En este contexto, se observó una correlación entre la unión a sG y la inhibición de la fusión por grupos de anticuerpos divididos en neutralizantes buenos (m101 y m102) y malos (el resto), aunque no se encontró una correlación directa calculada matemáticamente entre la afinidad medida mediante Biacore de cada anticuerpo por sG y la actividad inhibidora de la fusión.

Para encontrar otras posibles correlaciones entre la unión y la inhibición, los inventores midieron la unión a la glucoproteína G nativa, que se inmunoprecipitó a partir de lisados de células infectadas con virus vacunales recombinantes. La extensión de la inmunoprecipitación, que es proporcional a la afinidad de unión del anticuerpo a la glucoproteína G de longitud completa nativa, fue el más elevado para m101 que se une a glucoproteína G de HeV (Fig. 3). Dos de estos anticuerpos, m102 y m106, demostraron una reactividad cruzada significativa con la glucoproteína G tanto de HeV como de Niv (Fig. 3). Los niveles de inmunoprecipitación se correlacionaron con la fusión celular (Tabla 3), lo que indica que la unión a la glucoproteína G nativa es un mejor correlato de la actividad inhibidora de la fusión que la unión a la glucoproteína G soluble.

Mejora competitiva con respecto a la efrina-B2 receptora como mecanismo de inhibición de la entrada del virus mediante m101 y m102

Para definir adicionalmente el mecanismo de inhibición de la entrada de virus por el neutralizante más potente m101, los inventores midieron su competición con el receptor recientemente identificado para los virus Hendra y Nipah

efrina-B2 (Bonaparte M.I. et al. 2005 Proc Natl Acad Sci USA 102:10652-10657). M101 compitió con efrina-B2 por la unión a sG; IgG m101 fue un competidor mucho mejor que Fab m101 (Fig. 4), que se correlaciona con su actividad inhibidora, probablemente debido a la naturaleza multivalente de su interacción. Se obtuvieron resultados similares con m102 y mediante el uso de Biacore (Fig. 2 suplementaria en Bonaparte M.I. et al. 2005 Proc Natl Acad Sci USA 102:10652-10657). Estos datos indican que m101 y m102 inhiben la entrada del virus Hendra y probablemente del virus Nipah evitando el acceso de estos virus a su receptor. También indican que los epítomos de m101 y m102 solapan con el sitio de unión al receptor en la glucoproteína G. De forma interesante, m106 compitió con efrina-B2 de forma mucho más débil que m101 y solo a concentraciones muy elevadas (Fig. 4).

10 Caracterización adicional de los epítomos de los anticuerpos anti-glucoproteína G seleccionados

Para caracterizar adicionalmente los epítomos de los anticuerpos recientemente identificados, los inventores midieron la competición m101, m102, m103, m106 y m107 entre sí mediante ELISA (actualmente no hay anticuerpos frente a la glucoproteína G de Hendra con epítomos conocidos). Los anticuerpos m101, m102 y m103 compitieron entre sí, lo que indica que se unen a epítomos solapantes que son distintos de los epítomos de m106 y m107. De forma interesante, parece que m103 es sinérgico con m106, lo que produce un aumento de la unión de uno en presencia del otro. Estos resultados indican que m101-3 pueden neutralizar el virus mediante un mecanismo diferente de m106 y m107, pero son necesarios estudios adicionales de competición con efrina para elucidar definitivamente el mecanismo de su actividad neutralizante.

En un intento inicial de localizar los epítomos de m101 y m102, los inventores midieron su unión a un panel de 10 mutantes de barrido de alanina de la glucoproteína G, seleccionados para representar diferentes porciones de la proteína: G183A, L184A, P185A, (Q191, K192A), S195A, D289A, K324A, (I385, H386A), L517A, N570A, en las que los dos mutantes dobles están entre paréntesis. De estos mutantes, solo uno, G183A, disminuye la unión tanto de m101 como de m102 a la glucoproteína G; este mutante se unió fuertemente a anticuerpos policlonales de conejo anti-glucoproteína G y a la efrina-B2 receptora. (Fig. 5). El resto G183 está localizado en la base de la cabeza globular de la proteína G según una estructura modelo (Yu M. et al. 1998 Virology 251:227-233), y podría ser una parte del epítomo del anticuerpo que no solapa con el sitio de unión al receptor en la glucoproteína G. Parece que otro resto, N570, disminuye la unión de m102 a la glucoproteína G, pero no la unión de m101 ni la del receptor (Fig. 5). Este resto podría ser una parte del epítomo de m102 que no solapa con el epítomo de m101 ni con el sitio de unión al receptor en la glucoproteína G.

Tabla 1: Selección de clones de fagos con secuencias únicas que muestran unión significativa a sG

Fab	Secuencia H3	A ₄₅₀
m101	D P G G Y S Y G P Y Y Y Y Y G M D V	1,0
m102	G W G R E Q L A P H P S Q Y Y Y Y Y Y G M D V	1,4
m103	D S R Y H D A F D I	0,8
m104	E S S W L D A F D I	0,7
m105	V G G I T G T A D A F D I	0,9
m106	D Q L A G Y Y Y D S S G Y H Y Y Y Y G M D V	1,6
m107	D H V H G P D A F D I	0,6
m108	V G G A F D I	0,5
m109	G W F R D W Y F D L	0,0
m110	E G L P E T D D A F D I	0,0
m111	E G A D Y	0,0
m112	D G A D Y	0,4
m113	Y K L Q S D A F D I	0,1
m114	A G P V G A T T G T F D Y	0,0
m115	G S Q S Y D H Y Y Y Y	0,4
m116	D S A G L G A	0,3
m117	R E S G P E F F Q H	0,0

La detección selectiva de 380 clones de fagos individuales se llevó a cabo en ELISA de fagos con sG, como se describe en el Ejemplo 1. Se muestran las secuencias de las CDR3 de HC (las H3) de los Fab presentados en fagos que mostraron unión significativa a sG en ELISA de fagos, según se identifican de acuerdo con la base de datos de IMGT (<http://imgt.cines.fr>). Los Fab solubles se expresaron, se purificaron y se analizaron mediante ELISA para determinar la unión a sG. La absorbancia de la disolución a 450 nm (A₄₅₀) se muestra como una medida de la fortaleza de la unión.

Tabla 2: Familias de genes V y número de aminoácidos cambiados en comparación con la línea germinal

Anticuerpo	Familia de VH	Familia de VL	Cambios en VH	Cambios en VL
m101	VH1	Vk1	2	6
m102	VH1	Vk3	5	8
m103	VH3	Vk2	0	0
m104	VH1	Vk2	0	13
m105	VH3	Vk1	0	0
m106	VH1	Vk1	0	0
m107	VH1	Vλ1	1	3
Se muestran las familias de genes para los genes de VH, que son específicos de IgM, y para los genes de VL, que son todos de las clases de Ig, y sus variaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal.				

Tabla 3: Inhibición de la fusión celular mediada por Env de HeV mediante los Fab seleccionados

Fab	HeV	NiV
M101	+++	+
m102	++	++
m103	+	0
m104	+	+
m105	0	+
m106	+	++
m107	0	+
m108-17	0	0
X5	0	0
Los Fab anti-glucoproteína G de HeV se usaron para la inhibición de la fusión como se describe en el Ejemplo 1. Se muestra un resumen de cuatro experimentos diferentes, en los que cada + es una medida del aumento de la actividad inhibidora y 0 significa actividad de fusión no mensurable en comparación con el valor de fondo. Fab X5 es un anticuerpo de control específico de la gp120 de VIH-1 (Moulard, M. et al. 2002 Proc Natl Acad Sci USA 99:6913-6918).		

5

Tabla 4: Neutralización de HeV infeccioso mediante IgG1 m101

Concentración del anticuerpo (µg/ml)	Número de focos por pocillo en cada réplica				Número promedio de focos (% de neutralización)
25	0	0	0	0	0 (100)
12,5	0	0	0	0	0 (100)
6,2	0	0	1	0	0,25 (99)
3,1	1	0	1	0	0,5 (98)
1,6	1	1	0	0	0,5 (98)
0,8	5	2	2	2	2,75 (91)
0	30	37	34	30	33 (0)
IgG1 m101 se incubó con HeV infeccioso y la mezcla se añadió a células Vero cultivadas en placas. Después de la incubación durante 30 minutos, las mezclas de anticuerpo-virus se eliminaron, las células se lavaron y se añadió a las células EMEM-10 recién preparado que contiene anticuerpo recién producido y se incubó toda la noche. El número promedio de focos en ausencia de anticuerpo fue 33. El porcentaje de neutralización mostrado más adelante entre paréntesis se calculó restando al número de focos en los pocillos con anticuerpos el número de focos sin anticuerpos, y dividiendo el número resultante entre el número de focos sin anticuerpos, y multiplicando por 100.					

Tabla 5: Constantes de velocidad de unión y afinidades de los Fab seleccionados

Anticuerpo	k_a ($\times 10^4$) $M^{-1} s^{-1}$	k_d ($\times 10^{-3}$) s^{-1}	Kd, nM
m101	13	3,5	28
m102	57	0,068	1,2
m103	*	*	1800
m104	0,3	1,6	600
m105	7,4	5,1	69
m106	6,2	3,3	54
m107	30	2,2	78

La interacción entre diversos Fab y sG se analizó a 25 °C mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial. Se inyectaron Fab a diferentes concentraciones a un caudal de 30 μ l/min y los datos de las fases de asociación y de disociación se ajustaron simultáneamente a un modelo global de Langmuir 1:1 usando el programa de análisis de datos no lineal BIAevaluation 3.2. La constante de velocidad de asociación, k_a , la constante de velocidad de disociación, k_d , y la constante de disociación en el equilibrio, Kd, individuales se obtuvieron a partir de al menos tres experimentos distintos. La desviación estándar fue, de media, alrededor del 20 %. * indica que solo se calculó la afinidad en estado estacionario, debido a la cinética rápida.

Discusión

- 5 El hallazgo principal de este estudio es la identificación de un anticuerpo, m101, con potencia excepcional frente al virus HeV infeccioso. También se identificaron otros seis anticuerpos que son específicos de la glucoproteína G de HeV y dos de ellos reaccionaron significativamente de forma cruzada con la glucoproteína G de NiV. Según el conocimiento de los inventores, estos anticuerpos son los primeros anticuerpos monoclonales humanos (hmAb) identificados frente a HeV y NiV. De forma interesante, el único anticuerpo monoclonal, Synagis (Pollack, P. y Groothuis, J. R. 2002 J Infect Chemother 8:201-206) (palivizumab, MEDI-493), aprobado por la FDA para uso clínico frente a una enfermedad vírica (Dimitrov, D. S. 2004 Nat Rev Microbiol 2:109-122), es también específico de un paramixovirus, el virus sincitial respiratorio (VSR) ; es una versión humanizada de un anticuerpo de ratón y se usa para la prevención de infecciones por VSR en neonatos y en individuos inmunodeprimidos. Synagis inhibe *in vitro* de forma muy potente la entrada del virus y la fusión celular; parece que su eficacia *in vivo* se correlaciona con su potencia *in vitro* y se ha propuesto que su actividad inhibidora de la fusión podría ser un determinante importante de su potencia *in vivo* (Johnson, S. et al. 1999 J Infect Dis 180:35-40). Debido a que el VSR y los henipavirus entran en las células mediante la misma ruta, la fusión de la superficie celular, y no a través de endocitosis, como lo hacen la mayoría de otros virus con cubierta (Dimitrov, D. S. 2004 Nat Rev Microbiol 2:109-122), y son miembros de la misma familia vírica, los inventores predicen que m101 puede ser igualmente, si no más, eficaz frente a HeV que lo es palivizumab frente al VSR.

Cada uno de los Fab recién identificados se examinó en ensayos de fusión celular mediada por HeV y NiV para evaluar su potencial a la hora de bloquear la unión y/o el proceso de fusión de membrana posterior. El Fab m101 demostró la actividad inhibidora más potente de la fusión celular y m102 mostró actividad de reacción cruzada frente a tanto HeV como NiV. El mecanismo mediante el cual m101 y m102 inhiben la fusión e infección de HeV es bloqueando la interacción de la glucoproteína G con efrina-B2, que se ha identificado recientemente como un receptor funcional para HeV y NiV (Bonaparte et al. 2005 Proc Natl Acad Sci USA 102:10652-10657) (la función receptora de efrina-B2 para NiV también se identificó independientemente usando un enfoque diferente (Negrete O.A et al. 2005 Nature 436:401-405)). Sin embargo, una posibilidad alternativa es que estos anticuerpos se unen a la glucoproteína G y también pueden evitar su interacción requerida con la glucoproteína F para poner en marcha el proceso de fusión. Hubo una correlación general entre su actividad inhibidora y la afinidad de unión de los Fab a la glucoproteína G, especialmente a la proteína asociada a la membrana nativa, según se mide mediante inmunoprecipitación.

- 35 La conversión de Fab m101 en IgG1 condujo a una neutralización potente del HeV infeccioso, que neutralizó más del 90 % a una concentración menor que 1 μ g/ml. Se podría teorizar que esto puede deberse al aumento de estabilidad y la avidez del anticuerpo, y/o a su capacidad para reticular la glucoproteína G oligomérica sobre las superficies de los virus y las células infectadas. No obstante, la potencia extrema de IgG1 m101 en ensayos de neutralización de HeV infeccioso sugiere que puede ser importante convertir otros Fab en IgG1 para la evaluación como hmAb neutralizantes potentes.

45 Existe una considerable homología de aminoácidos entre las Env F y G de NeV y NiV (Harcourt, B. H. et al. 2000 Virology 271:334-349; Wang, L. et al. 2001 Microbes Infect 3:279-287). Estudios previos han demostrado que los antisueros de HeV y NiV no neutralizan de forma cruzada, siendo cada suero ligeramente menos eficaz frente al virus heterotípico (Crameri, G. et al. 2002 J Virol Methods 99:41-51; Tamin, A. 2002 Virology 296:190-200). Además, las glucoproteínas de HeV y NiV se pueden complementar funcionalmente entre sí a la hora de mediar la fusión de

membranas con eficiencia de tipo salvaje (Bossart, K. N. y Broder, C. C. 2004 Methods Mol Biol 269:309-332; Bossart, K. N. et al. 2002 J Virol 76:11186-11198). De este modo, los inventores han anticipado que si se identificasen anticuerpos usando sG de HeV, algunos deberían presentar unión reactiva cruzada a epítomos compartidos entre HeV y NiV. De hecho, dos de los siete Fab fueron capaces de reaccionar igualmente bien en la

- 5 inmunoprecipitación de la glucoproteína G de HeV y NiV asociada a la membrana recombinante. Además, m102 fue capaz de inhibir la fusión mediada por HeV y por NiV y puede reflejar un epítipo conservado entre estos virus que podría ser importante no solo para la neutralización sino también para el mecanismo de entrada. Con la conversión en una IgG1, m102 puede ser capaz de neutralizar de forma potente tanto a HeV como a NiV.
- 10 Los ensayos de competición de unión de anticuerpos revelaron que el panel de los Fab desarrollado aquí comprende dos grupos distintos y los Fab en cada grupo poseen epítomos que solapan. El análisis de los FAb anti-glucoproteína G mediante transferencia de tipo Western no reveló reactividad con la glucoproteína G, lo que indica que los epítomos reconocidos por estos Fab dependen probablemente de la conformación. Los neutralizantes más potentes, m101 y m102, se unieron a la mayoría de los mutantes de alanina analizados, excepto uno, que parece
- 15 que está localizado en la base de la cabeza globular de la glucoproteína G según un modelo de su estructura (Yu M. et al 1998 Virology 251:227-233). Para localizar de forma precisa sus epítomos son necesarios estudios adicionales.

Tomados en conjunto, los resultados demuestran nuevos inmunotratamientos frente a HeV y NiV. También es de esperar que estos anticuerpos humanos sean útiles para el diagnóstico, como reactivos de investigación, y que sirvan como base para vacunas.

Ejemplo 1

Células y condiciones de cultivo

- 25 Las células HeLa-USU las proporcionaron Anthony Maurelli, Uniformed Services University (USU). HeLa-ATCC se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC nº CCL 2). Las células Vero las proporcionó Alison O'Brien, USU. La línea celular de glioblastoma humano U373-MG la proporcionó Adam P Geballe, Fred Hutchinson Cancer Research Center (Harrington R.D. 1993 J Virol 67:5939-5947). La línea celular PCI 13 de carcinoma de cabeza y cuello humano fue un regalo de Ernest Smith, Vaccinex, Inc. Las células HeLa-USU, HeLa-ATCC y U373 se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (Quality Biologicals, Gaithersburg, MD.) suplementado con
- 30 10 % de suero de ternera cósmico (CCS) (HyClone, Logan, UT) y 2 mM de L-glutamina (DMEM-10). Las células PCI 13 se mantuvieron en DMEM-10 suplementado con HEPES 1mM (Quality Bio.). Las células Vero se mantuvieron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (Quality Bio.) suplementado con 10 % de suero de ternera cósmico (CCS) (HyClone) y 2 mM de L-glutamina (EMEM-10). Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

Mutantes de alanina de glucoproteína G

- 40 Las mutaciones de alanina se realizaron en restos específicos en la glucoproteína G de HeV marcada con myc usando mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene). Todos los mutantes se secuenciaron y se analizaron para determinar la expresión. Los plásmidos que contienen Gmyc de HeV mutante o de tipo salvaje se transfectaron en monocapas de HeLa USU usando Eugene (Roche) y se incubaron durante toda la noche. La inmunoprecipitación de la glucoproteína G mutante se llevó a cabo como se describe más adelante en la sección Inmunoprecipitación, excepto que se incubaron 3,0 µg de m101 o m102, o 5 µl de antisuero policlonal de conejo anti-glucoproteína G de
- 45 α-sHeV, con 80 µl de lisados durante la noche a 4 °C, seguido de precipitación a temperatura ambiente con 100 µl de Proteína G al 20 % en Sepharose, durante 45 minutos.

Selección de Fab presentados en fagos específicos de glucoproteína G

- 50 Se usó una biblioteca de expresión e fagos de Fab humanos no expuestos anteriormente (un total de aproximadamente 10¹⁰ miembros) construida con linfocitos B de sangre periférica de 10 donantes sanos para la selección de los Fab frente a glucoproteína G de HeV soluble y oligomérica purificada (sG) (Bossart, K. N. et al. 2005 J Virol 79:6690-6702), conjugada a perlas magnéticas (Dynabeads M-270 Epoxy, DYNAL Inc., New Hyde Park, New York). Las bibliotecas amplificadas de 10¹² Fab presentados en fagos se incubaron con 5, 3, 3 y 1 µg de sG en un volumen de 500 µl durante 2 horas a temperatura ambiente durante las rondas 1^a, 2^a, 3^a y 4^a de la bioselección, respectivamente. Después de cada ronda de incubación, las perlas se lavaron 5 veces para la primera ronda y 15 veces para las rondas posteriores con PBST (PBS que contiene 0,05 % de Tween-20) para eliminar el fago unido de forma inespecíficamente, los fagos unidos a las perlas se mezclaron con células TG1 durante una hora a 37 °C, el
- 60 fago se amplificó a partir de las células infectadas y se usó en la siguiente ronda de bioselección. Después de la 4^a ronda de bioselección, se escogieron al azar 380 clones de las células TG1 infectadas, y cada uno de ellos se inoculó en 150 µl de medio 2YT que contiene 100 µg/ml de carbenicilina y 0,2 % de glucosa en placas de 96 pocillos usando el sistema de recogida de colonias automatizado BioRobotics BioPick (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI). Después de que los cultivos bacterianos alcanzaron una densidad óptica (DO) de 0,5 a 600 nm, se añadió al medio el fago auxiliar M13K07 a una MOI de 10 y kanamicina a 50 µg/ml de concentración final y las placas se incubaron adicionalmente a 30 °C toda la noche en un agitador a 250 rpm. Los sobrenadantes de los fagos se mezclaron con
- 65

leche desnatada al 3 % en PBS a una relación de volumen 4:1, y se usaron para el ELISA para identificar clones de los Fab que poseen afinidad de unión elevada por sG y que se presentan en fagos. Los sobrenadantes se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con proteína sG revestida a 50 ng por pocillo en placas de 96 pocillos y se lavaron 5 veces con PBST. (sG se revistió en 50 µl de tampón de revestimiento (NaHCO₃ 50mM a pH 9,6) ; después de la incubación durante toda la noche a 40 °C se bloqueó con leche desnatada al 3 % en PBS, y se lavó 3 veces con PBS que contiene 0,05 % de Tween-20). Los fagos unidos a glucoproteína G soluble se detectaron usando anticuerpo de cabra anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano. Tras la incubación con el anticuerpo, el anticuerpo unido no específicamente se lavó, se añadió el sustrato TMB y se midió la absorbancia de la disolución a 450 nm (A₄₅₀). Los clones que se unieron a sG con A₄₅₀ > 1,0 se seleccionaron para su caracterización posterior.

Expresión y purificación de los Fab solubles seleccionados

Las V_H y V_L de los clones seleccionados se secuenciaron y los Fab codificados por clones con secuencias únicas se expresaron y purificaron como se describe más adelante. Los plásmidos extraídos de estos clones se usaron para la transformación de células HB2151. Se recogió una única colonia de la placa que contiene células recientemente transformadas, se inoculó en 200 ml de medio 2YT que contiene 100 µg/ml de ampicilina y 0,2 % de glucosa y se incubó a 37 °C con agitación a 250 rpm. Cuando la DO del cultivo a 600 nm alcanzó 0,90 se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM y el cultivo se incubó adicionalmente toda la noche a 30 °C. El sedimento bacteriano se recogió después de la centrifugación a 8.000 g durante 20 minutos y se resuspendió en tampón de PBS que contiene 0,5 mU de pollmixina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Después de incubación durante 30 minutos con rotación a 50 rpm a temperatura ambiente, se centrifugó a 25.000 g durante 25 minutos a 4 °C y el sobrenadante se usó para la purificación de los Fab con columna de proteína G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Conversión de Fab en IgG1 y expresión y purificación de IgG1

Las cadenas pesada y ligera de Fab se amplificaron y se volvieron a clonar en el vector PDR12 (proporcionado por D. Burton, the Scripps Research Institute, La Jolla, CA) para la expresión de IgG1 completa. La construcción resultante se transfectó y la IgG1 se expresó usando el kit de expresión FreeStyle™ 293 Expression Kit siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La IgG1 se purificó del medio de cultivo con una columna de proteína G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Determinación de la afinidad mediante resonancia de plasmón superficial

Las interacciones entre los diversos Fab y la glucoproteína G se analizaron mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE 1000 (Biacore, Pharmacia, Piscataway, NJ). La sG se inmovilizó covalentemente sobre un chip sensor (CM5) usando química de acoplamiento con carbodiimida. Para la unión no específica y los cambios del índice de refracción se preparó una superficie de referencia de control. Para el análisis de la cinética de las interacciones, se inyectaron concentraciones variables de los Fab (300, 100, 33, 11 y 3, 7 nM) a un caudal de 30 µl/min., usando un tampón de carrera que contiene NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,005 % de P-20 (pH 7,4). Los datos de las fases de asociación y de disociación se ajustaron simultáneamente a un modelo global de Langmuir 1:1 usando el programa de análisis de datos no lineal BIAevaluation 3.2. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C.

ELISA de competición

Los Fab m101, m102, m103, m106 y m107 se revistieron a 150, 50, 300, 300 y 100 ng por pocillo, respectivamente, en 50 µl de tampón de revestimiento como se ha descrito anteriormente para sG, se bloquearon con leche desnatada y se lavaron. A cada uno de los pocillos revestidos con los Fab se añadió sG marcada con c-Myc mezclada con cada uno de los Fab en tampón de bloqueo a una concentración final de 5 µg/ml y 20 µg/ml, respectivamente; como control positivo, a cada uno de los Fab revestidos se añadió sG (5 µg/ml) sin anticuerpo. La proteína sG marcada con c-myc unida se detectó mediante un anticuerpo anti-c-myc conjugado con HRP (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN); se añadió el sustrato TMB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se midió la A₄₅₀.

Inmunoprecipitación

Monocapas de HeLa-USU se infectaron con glucoproteína G de HeV o glucoproteína G de NiV marcada con myc que expresa el virus vacunal de tipo salvaje (WR) o el virus vacunal recombinante a una MOI de 10 durante 6 horas, después se lavaron dos veces y se incubaron durante la noche en medio esencial sin metionina y cisteína más 2,5 % de suero bovino fetal dializado (Invitrogen) y 100 µCi de [³⁵S] ProMix/ml (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Las células se lisaron en Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM y 1 % de Triton X-100. Los lisados se incubaron con cada Fab a una concentración de 1 µg por 100 µl de lisado durante al menos una hora a 4 °C, seguido de la precipitación a temperatura ambiente con 100 µl de Proteína G al 20 %-Sepharose (Amersham) durante 45 minutos. El anticuerpo anti-myc 9E10 (Roche Molecular Biochemicals) se usó a una concentración de 2 µg por 100 µl de lisado. Las muestras se lavaron dos veces con tampón de lisis, seguido de un lavado con tampón DOC que contiene Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, 0,1 % de desoxicolato de sodio y 0,1 % de SDS. Las

muestras se llevaron a ebullición en tampón de muestra de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) con 2-mercaptoetanol y se analizaron mediante SDS-PAGE y autorradiografía.

Ensayos de fusión celular

5

La fusión entre las células que expresan la glucoproteína de la cubierta F y G de HeV y NiV (células efectoras) y las células diana se midió mediante dos ensayos: en primer lugar, un ensayo de gen indicador, en el que el citoplasma de una población celular contenía ARN polimerasa de T7 codificada por el virus vacunal y el citoplasma de la otra contenía el gen lacZ de *E. coli* ligado al promotor de T7; la β -galactosidasa (β -Gal) solo se sintetiza en células fusionadas (Bossart, K. N. y Broder, C. C. 2004 *Methods Mol Biol* 269:309-332; Nussbaum, O. et al. 1994 *J Virol* 68:5411-5422), y en segundo lugar, un ensayo de sincitios. Típicamente, la expresión de las glucoproteínas F y G de HeV y de NiV se lleva a cabo en un derivado de la línea celular HeLa negativo a la fusión e infección por HeV y NiV (HeLa-USU). El análisis citogenético ha confirmado que la línea celular HeLa-USU resistente a la fusión de membrana mediada por NiV y HeV y a la infección por el virus vivo deriva de la línea celular HeLa de ATCC (CCL2). Las proteínas codificadas por el virus vacunal (Bossart, K. N. et al. 2001 *Virology* 290:121-135) se produjeron infectando células a una MOI de 10 e incubando las células infectadas a 31 °C durante la noche. Las reacciones de fusión celular se llevaron a cabo con las diversas mezclas celulares en placas de 96 pocillos a 37 °C. Típicamente, la relación entre células que expresan la glucoproteína de la cubierta y células diana fue de 1:1 (2×10^5 células totales por pocillo, volumen total de 0,2-ml). Se añadió arabinósido de citosina (40 μ g/ml) a la mezcla de la reacción de fusión, para reducir la producción no específica de β -Gal. Para análisis cuantitativos, se añadió Nonidet P-40 (0,5 % final) a 2,5 horas y se evaluaron alícuotas de los lisados para determinar β -Gal a temperatura ambiente con el sustrato D-galactopiranosido de rojo de clorofenol (CPRG; Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN). Para la inhibición mediante anticuerpos se realizaron diluciones en serie de anticuerpos y se añadieron a poblaciones de células efectoras 30 minutos antes de la adición de las poblaciones de células diana. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado y los datos de fusión se calcularon y se expresaron como tasas de actividad de β -Gal (cambio en la DO a 570 nm por minuto $\times$ 1.000) (Nussbaum, O. et al 1994 *J Virol* 68:5411-5422). Se normalizaron con respecto a la fusión celular en ausencia de anticuerpos y se representaron gráficamente como función de la concentración de anticuerpos.

El ensayo de sincitios se realizó en placas de 48 pocillos. Las células PCI-13 diana se cultivaron en placas hasta alcanzar una confluencia del 80 % en el momento del experimento. Células efectoras, HeLa USU, que no son permisivas a la fusión mediada por Env de HeV y Env de NiV, se infectaron con virus vacunal recombinante para expresar proteínas G y F de HeV. Tres pocillos de una placa de seis pocillos con HeLa-USU confluentes al 80 % se incubaron con ambos virus vacunales recombinantes, que codifican la glucoproteína G de HeV y la glucoproteína F de HeV, MOI de 10 para cada virus, a 37 °C durante 3 horas en DMEM-10 que contiene 2,5 % de suero cósmico de ternera, 1 ml por pocillo, después se lavaron una vez y se disociaron de las placas usando 0,5 ml por pocillo de tampón de disociación celular a base de PBS libre de enzimas (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Las células se reunieron en un tubo de centrifuga estéril de 50 ml (Corning Inc., Corning, NY) y se añadieron 20 ml de DMEM-10. La suspensión se incubó 16 horas a 31 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Antes del experimento, las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en DMEM-10. Las células se contaron, se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 células/ml. Se añadió arabinósido de citosina, hasta una concentración de 80 μ g/ml. Cien microlitros de esta suspensión celular se mezclaron con la misma cantidad de DMEM-10 que contiene el anticuerpo y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las mezclas se añadieron a las células diana PCI-13 lavadas recientemente (con DMEM-10) en la placa de 48 pocillos y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Se tomaron fotografías usando el modo de contraste de fases de un microscopio Olympus IX81 con una lente objetivo de 10 aumentos y después se amplificaron electrónicamente siempre que fue necesario.

Ensayos de neutralización de HeV y NiV

50

Todos los experimentos con virus vivos se llevaron a cabo con procedimientos estrictos de biocontención en un laboratorio BSL-4. Se añadieron 2×10^4 células Vero a pocillos en 150 μ l de EMEM-10 en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C durante toda la noche en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Los anticuerpos se diluyeron en EMEM-10 mediante dilución duplicadora y se añadió a cada dilución un volumen igual de HeV o NiV y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El título de HeV fue $1,0 \times 10^8$ DICT₅₀/ml, y el de NiV fue $3,0 \times 10^7$ DICT₅₀/ml. Se realizaron diluciones de virus en EMEM-10 y se escogieron para generar 50 placas tras la adsorción de virus durante 30 minutos a 37 °C a monocapas de células Vero ($1,5 \times 10^3$ DICT₅₀/ml para HeV y $7,5 \times 10^2$ DICT₅₀/ml para NiV). Las mezclas de anticuerpos-virus se añadieron a monocapas de células Vero por cuadruplicado y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Después de incubar durante 30 minutos, las mezclas de anticuerpos-virus se eliminaron y las células se lavaron 3 veces con PBS sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺. Se llevaron a cabo dos variaciones diferentes de este ensayo. En la primera, se añadió EMEM-10 a las células Vero después de lavar y se incubaron toda la noche. En la segunda, la misma dilución de anticuerpos, tanto como preincubación como incubación del virus, se añadió a los pocillos respectivos y se incubó durante toda la noche. Para ambos ensayos, el medio de cultivo se desechó al día siguiente y las placas se sumergieron durante 20 minutos en metanol absoluto enfriado con hielo antes de secar al aire fuera de la instalación de nivel 4 de peligro biológico. Los portaobjetos de cámara fijos se almacenaron toda la noche a 4 °C o se inmunomarcaron

65

inmediatamente con antisuero monoespecífico anti-fosfoproteína (P) (Michalski, W. P. et al. 2000 Virus Res 69:83-93). Los pocillos se lavaron en PBS 0,01 M a pH 7, 2, que contiene 1 % de BSA, durante 5 minutos. Se aplicaron 40 µl de antisuero anti-P (1:200 en PBS-BSA) a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Los portaobjetos se aclararon con PBS que contiene 0,05 % de Tween 20 (PBS-T) y se lavaron durante 5 minutos en PBS-BSA.

5 Después, a cada pocillo se aplicaron 40 µl de antisuero anti-conejo de cabra marcado con FITC (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA) diluido 1:200 en PBS-BSA que contiene DAPI (10 µg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Los pocillos se aclararon nuevamente con PBS que contiene 0,05 % de Tween 20 (PBS-T) y se lavaron durante 5 minutos en PBS-BSA. Los pocillos se taparon con 100 µl de glicerol/PBS (9:1) que contiene DABCO (25 µg/ml) y se almacenaron en oscuridad antes de la obtención de imágenes. La inmunofluorescencia de
10 FITC se visualizó usando un microscopio invertido Olympus IX71 (Olympus Australia, Mt. Waverley, Australia). El porcentaje de neutralización a una concentración dada de anticuerpo se calculó como la relación del número promedio de focos por pocillo debidos al efecto citopático (CPE) y el mismo número para el control positivo, multiplicado por 100.

15 La neutralización de HeV y NiV mediante los Fab se llevó a cabo según lo siguiente. Los Fab se diluyeron en EMEM-10 mediante dilución duplicadora y se añadió a cada dilución un volumen igual de EMEM-10 que contiene 200 DICT₅₀/ml DE HeV o NiV y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El título de HeV fue $1,0 \times 10^8$ DICT₅₀/ml, y el de NiV fue $3,0 \times 10^7$ DICT₅₀/ml. Se añadieron 2×10^4 células Vero a cada mezcla de Fab-virus en seis pocillos duplicados y se incubaron durante 5 días. La neutralización mediante Fab se determinó por el nivel de efecto
20 citopático (CPE) en pocillos duplicados a cada concentración de Fab.

Ejemplo 2

Maduración por afinidad de m102

25 Como fuente del repertorio de VL en la biblioteca barajada se usó la biblioteca de presentación en fagos de Fab humana original, a partir de la cual se identificaron los anticuerpos m101-m107. La preparación de fagémidos procedente de la biblioteca original se dirigió primero con Nco I y Spe I, seguido de electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos génicos VH y CH1 del vector esqueleto que contiene las cadenas ligeras de los
30 anticuerpos, para suprimir todo el repertorio de VH. El gen que codifica el dominio VH del clon m102 se amplificó mediante el kit PCR propensa a errores, de Stratagene, para introducir mutaciones al azar y después se fusionó con el fragmento génico CH1 mediante SOE PCR. El fragmento fusionado se dirigió con NcoI y Spe I y se purificó a partir del gel y seguidamente se ligó en el vector esqueleto purificado para crear el repertorio de Fab de VL barajados.

35 Las células TG1 de *E. coli* se transformaron con las mezclas de ligación mediante electroporación. Las células TG1 transformadas se cultivaron en placas de agar 2YT que contienen 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa. Tras la incubación durante la noche a 37 °C, todas las colonias que crecieron en las placas se rasparon en 5 ml de medio 2YTAG, se mezclaron con 1,2 ml de glicerol al 50 % (concentración final 10 %), se repartieron en alícuotas y se
40 almacenaron a -70 °C como el lote madre de la biblioteca.

El lote madre de la biblioteca (100 µl) se cultivó hasta la fase logarítmica en 20 ml de medio 2YT, se rescató con el fago auxiliar M13K07 y se amplificó durante la noche en medio 2YT (2YT que contiene 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina) a 34 °C. La preparación de fagos se precipitó en 4 % de PEG, NaCl 0,5 M, se resuspendió en
45 1 ml de PBS como el lote madre de biblioteca de fagos. Se llevaron a cabo dos rondas de bioselección en perlas magnéticas conjugadas con glucoproteína G de Hendra, como se describe en la selección de la biblioteca original. Se identificaron 9 clones como anticuerpos madurados por afinidad y se seleccionó m102.4 para una caracterización posterior.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

55 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS CONTRA LOS VIRUS HENDRA Y NIPAH

<130> P031407EPA

<150> US 60/661766

60 <151> 14-03-2005

<150> US 60/678547

<151> 05-05-2005

65 <150> US 60/718902

<151> 20-09-2005

<160> 416

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 127

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
      20      25

```

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1      5

```

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1      5      10      15
Gly Ile

```

ES 2 546 543 T3

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 5

 Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5

 10
 <210> 6
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15
 <400> 6

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

 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 25
 <400> 7

 Ala Arg Asp Pro Gly Gly Tyr Ser Tyr Gly Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Met Asp Val
 20

 30
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 8

 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 35

 <210> 9
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 40
 <400> 9

ES 2 546 543 T3

```

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

```

<210> 10
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
           20           25

```

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

```

Gln Gly Ile Gly Pro Trp
 1           5

```

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile
 1           5           10           15
Tyr

```

<210> 13
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

```

Arg Ala Ser
 1

```

<210> 14
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

```

Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1           5           10           15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
          20           25           30
Thr Tyr Tyr Cys
          35

```

5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 15

```

Gln Gln Ala His Ser Phe Pro Phe Thr
 1           5

```

15

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 16

```

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
 1           5           10

```

25

<210> 17
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 17

```

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

```

35

<210> 18
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 546 543 T3

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser
 20 25

5

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 19

Gly Gly Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
 1 5

15

<210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 20

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile

25

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

<400> 21

30

Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
 1 5

35

<210> 22
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

40

<210> 23
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45

<400> 23

ES 2 546 543 T3

Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

20

25

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

<400> 24

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 25
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

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

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

<400> 26

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 20 25

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

Gln Ser Ile Thr Asn Gly Arg
 1 5

ES 2 546 543 T3

<210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 28

 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

 1 5 10 15
 Tyr
 10
 <210> 29
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 29

 Gly Val Ser
 1
 20
 <210> 30
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 30

 Ser Arg Ala Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 30
 <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 31

 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Val Leu
 1 5
 35
 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 32

 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
 1 5 10
 45
 <210> 33
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

```

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

65      70      75      80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85      90      95
Arg Asp Ser Arg Tyr His Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
      100      105      110
Met Val Thr Val Ser Ser
      115

```

5

<210> 34

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 34

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
      20      25

```

15

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 35

```

Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr
 1      5

```

25

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 36

```

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1      5      10      15
Val Ile

```

35

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

40

Tyr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

5
<210> 38
<211> 38
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

10 35

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<400> 39

Ala Arg Asp Ser Arg Tyr His Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

20
<210> 40
<211> 11
<212> PRT
25 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30
<210> 41
<211> 116
<212> PRT
<213> *Homo sapiens* z 41

35 <400> 41

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

ES 2 546 543 T3

<210> 42
 <211> 26
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 42

 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25
 10
 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

 <400> 43

 Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
 1 5 10
 20
 <210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 44

 Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 30
 <210> 45
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 45

 Leu Gly Ser
 1
 40
 <210> 46
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 46

 Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 45
 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*

<400> 47

Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Tyr Thr
 1 5

5

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 48

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 1 5 10

15

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 49

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

25

<210> 50

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

35

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

40

ES 2 546 543 T3

<210> 52
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 52
 Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile Ile
 <210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 53
 Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5
 <210> 54
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 55
 Ala Arg Glu Ser Ser Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 56
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 57
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

```

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

```

5

<210> 58
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 58

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
      20      25

```

15

<210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 59

```

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly His Ile Tyr
 1      5      10

```

25

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

<400> 60

30

```

Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 1      5      10      15
Tyr

```

35

<210> 61
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 61

```

Met Ala Ser
 1

```

40

<210> 62
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Asn Arg Val Glu Thr Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Ile Tyr Tyr Cys
 35

<210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

Met Gln Ser Leu His Thr Thr Arg Thr
 1 5

<210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 64

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 1 5 10

<210> 65
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

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

<210> 66
 <211> 24
 <212> PRT

ES 2 546 543 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 20

5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 67

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

15

<210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 68

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10 15
 Val Ile

25

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 69

Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

35

<210> 70

<211> 40

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 70

40

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

<210> 71

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 71

Val Gly Gly Ile Thr Gly Thr Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 73
<211> 116
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 73

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

85 90 95
Thr His Trp Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala
115

<210> 74
<211> 26
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 74

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 75

Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

ES 2 546 543 T3

<210> 76
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 76
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 10
 <210> 77
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 77
 Lys Val Ser
 1
 20
 <210> 78
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 78
 Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 30
 <210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 79
 Met Gln Gly Thr His Trp Pro Phe Thr
 1 5
 35
 <210> 80
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 80
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
 1 5 10
 45
 <210> 81
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 81

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

<210> 82
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 82

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 83
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 83

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 84
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 84

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile

<210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 85

Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5

<210> 86
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 86

```

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

10

<210> 87
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 87

```

Ala Arg Asp Gln Leu Ala Gly Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr His
 1           5           10           15
Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
           20
    
```

20

<210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 88

```

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1           5           10
    
```

30

<210> 89
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 89

```

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

35

<210> 90
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 90

ES 2 546 543 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 20 25

<210> 91
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 91

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 92
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 92

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 93
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 93

Ala Ala Ser
 1

<210> 94
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 94

Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30
 Thr Tyr Tyr Cys
 35

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 95

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile Thr
 1 5

<210> 96
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 96

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 1 5 10

10

<210> 97
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 97

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

20

<210> 98
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 98

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 20

30

<210> 99
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 99

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

35

40

<210> 100
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 100

ES 2 546 543 T3

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Ile

<210> 101
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 101

Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 102
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 102

Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 103
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 103

Ala Arg Asp His Val His Gly Pro Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 104

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 105
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 105

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

<210> 106
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 106

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser
 20 25

<210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 107

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
 1 5

<210> 108
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 108

Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 109
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 109

Arg Asn Asn
 1

<210> 110
 <211> 36
 <212> PRT

ES 2 546 543 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 110

```

      Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
      1           5           10           15
      Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
      20           25           30
      Asp Tyr Tyr Cys
      35
  
```

5

<210> 111

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 111

```

      Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu His Val Val
      1           5           10
  
```

15

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 112

```

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

25

<210> 113

<211> 116

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 113

```

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

```

      Ala Arg Val Gly Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
      85           90           95
      Thr Val Ser Ser
      100           105           110
      Thr Val Ser
      115
  
```

35

<210> 114

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 546 543 T3

<400> 114

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

5 <210> 115
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 115

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

15 <210> 116
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 116

Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Tyr

25 <210> 117
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 117

Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile
 1 5

30 <210> 118
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 118

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

40 <210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 119

Ala Arg Val Gly Gly Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 120
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 120

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

10

<210> 121
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 121

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

20

<210> 122
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 122

25

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser
 20 25

30

<210> 123
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 123

35

Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr
 1 5

40

<210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 124

Val Gln Trp Tyr Arg Gln Ser Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val Ile
 1 5 10 15
 Tyr

5 <210> 125
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 125
 Glu Gly Tyr
 1
 10 <210> 126
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 126
 Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Thr Glu Asp
 20 25 30
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 35
 20 <210> 127
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 127
 Gln Ser Tyr Asp Ala Thr Asn His Gln Val Val
 1 5 10
 30 <210> 128
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 128
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10
 40 <210> 129
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 129

Gln Met Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

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

<210> 130
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 130

	Gln	Met	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
1			5					10							15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr								
			20					25								

<210> 131
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 131

Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr	Tyr
1				5			

<210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 132

Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
1				5				10						15	
Glu															

<210> 133
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 133

Ile	Asn	His	Ser	Gly	Ser	Thr
1				5		

<210> 134
 <211> 38
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 134

 Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr
 1 5 10 15
 Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

 10
 <210> 135
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

 <400> 135

 Ala Arg Gly Trp Phe Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

 20
 <210> 136
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 25 <400> 136

 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 30
 <210> 137
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 35 <400> 137

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

 40
 <210> 138
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 138

ES 2 546 543 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 20 25

<210> 139
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 139

Gln Asp Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 140
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 140

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 141
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 141

Ala Ala Ser
 1

<210> 142
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 142

Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala
 20 25 30
 Thr Tyr Phe Cys
 35

<210> 143
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 143

Leu Gln Asp Tyr Gln Tyr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 144
 <211> 11

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 144

5

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1

5

10

<210> 145
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 145

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

15

<210> 146
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 146

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser							
			20					25							

25

<210> 147
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 147

Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Ala
1				5			

35

<210> 148
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 148

ES 2 546 543 T3

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Ala

<210> 149
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 149

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 150
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 150

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

<210> 151
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 151

Ala Ser Glu Gly Leu Pro Glu Thr Asp Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 152
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 152

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 153
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 153

```

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

```

<210> 154
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 154

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
          20          25

```

<210> 155
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 155

```

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Tyr Asn Tyr
 1          5          10

```

<210> 156
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 156

```

Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 1          5          10          15
Tyr

```

<210> 157
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 157

```

Leu Gly Ser
 1

```

<210> 158
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 158

```

Arg Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1           5           10           15
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Asn Thr Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
           20           25           30
Val Tyr Tyr Cys
           35

```

5

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 159

```

Met Gln Gly Val Glu Ile Pro Phe Thr
 1           5

```

15

<210> 160

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 160

```

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1           5           10

```

25

<210> 161

<211> 114

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 161

```

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

```

35

<210> 162

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 162

ES 2 546 543 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser
 20 25

<210> 163
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 163

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 164
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 164

Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Leu

<210> 165
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 165

Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr
 1 5

<210> 166
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 166

Ile Tyr Ala Glu Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr
 1 5 10 15
 Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 167
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 167

Ala Thr Glu Gly Ala Asp Tyr
 1 5

<210> 168

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

5 <400> 168

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 169
<211> 114
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 169

15

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

<210> 170
<211> 26
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 170

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ala Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

25

<210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 171

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

35

<210> 172
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 172

ES 2 546 543 T3

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Leu
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 173
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 173

Lys Val Ser
 1

<210> 174
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 174

Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Ile Tyr Tyr Cys
 35

<210> 175
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 175

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 176
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 176

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 177
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 177

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

<210> 178
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 178

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser
 20 25

<210> 179
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 179

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 180
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 180

Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Leu Val

<210> 181
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 181

Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile
 1 5

<210> 182
 <211> 37
 <212> PRT

ES 2 546 543 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 182

```

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

```

5

<210> 183

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 183

```

Ala Thr Asp Gly Ala Asp Tyr
 1      5

```

15

<210> 184

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 184

```

Trp Asp Gln Gly Thr Leu Gly Thr Val Ser Thr
 1      5      10

```

25

<210> 185

<211> 111

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 185

```

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

```

35

<210> 186

<211> 26

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 186

40

ES 2 546 543 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser
 20 25

<210> 187
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 187

Ser Asn Ile Gly Gly Asp Ser Asp
 1 5

<210> 188
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 188

Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ser Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 189
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 189

Gly Asn Arg

1

<210> 190
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 190

Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Val Ile Gly Val Gln Ala Asp Asp Glu Ala
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Cys
 35

<210> 191
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 191

ES 2 546 543 T3

Gln Cys Tyr Asp Ser Ser Leu Asn Gly Tyr Val
1 5 10

<210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 192

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Ile Val Leu
1 5 10

<210> 193
<211> 119
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 193

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

<210> 194
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 194

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 195
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 195

Gly Gly Thr Phe Ser Ser
1 5

<210> 196
<211> 20

ES 2 546 543 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 196
 5 Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 1 5 10 15
 Met Gly Trp Thr
 20
 <210> 197
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 197
 15 Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 1 5
 <210> 198
 <211> 38
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 198
 Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 25 <210> 199
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 199
 Ala Asn Tyr Lys Leu Gln Ser Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 35 <210> 200
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 200
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 45 <210> 201
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 201

```

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

```

<210> 202
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 202

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
           20           25

```

<210> 203
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 203

```

Gln Asp Ile Gly Asn Phe Leu
 1           5

```

<210> 204
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 204

```

Val Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 1           5           10           15

```

<210> 205
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 205

```

Ala Ala Ser
 1

```

<210> 206
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 206

```

Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1      5      10      15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
      20      25      30
Thr Tyr Tyr Cys
      35

```

5 <210> 207
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 207

```

Gln His Tyr Lys Ser Tyr Pro Leu Thr
 1      5

```

15 <210> 208
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 208

```

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1      5      10

```

25 <210> 209
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 209

```

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

```

```

      100      105      110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115      120

```

30 <210> 210
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 210

ES 2 546 543 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 211
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 211

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5 10

<210> 212
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 212

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile
 1 5 10 15

<210> 213
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 213

Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5

<210> 214
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 214

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

<210> 215
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 215

Ala Arg Ala Gly Pro Val Gly Ala Thr Thr Gly Thr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 216
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 216

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

5

<210> 217

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 217

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

15

<210> 218

<211> 26

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 218

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 20 25

25

<210> 219

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 219

Gln Ser Val Ser Ser Ser
 1 5

35

<210> 220

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 220

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 1 5 10 15
 Ile Tyr

40

<210> 221

<211> 3

ES 2 546 543 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 221
 5 Gly Ala Ser
 1
 <210> 222
 <211> 36
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 222
 Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 15
 <210> 223
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 223
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr
 1 5
 25
 <210> 224
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 224
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 1 5 10
 35
 <210> 225
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 225

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

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

<210> 226
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 226

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 227
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 227

Gly Gly Thr Phe Arg Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 228
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 228

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile

<210> 229
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 229

Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5

ES 2 546 543 T3

<210> 230
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 230

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu

1	5	10	15
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp			
	20	25	30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
35			

10

<210> 231
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 231

Ala Arg Gly Ser Gln Ser Tyr Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15
Val

20

<210> 232
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 232

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30

<210> 233
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 233

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 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr	20 25 30
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	35 40 45
Met Ile Phe Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Leu	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 Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Asn	85 90 95
Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	100 105

35

<210> 234
 <211> 26
 <212> PRT

ES 2 546 543 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 234

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	Thr	Gly	Thr	Ser						
			20				25								

5

<210> 235

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 235

Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr
1				5			

15

<210> 236

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 236

Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile
1				5				10					15		
Phe															

25

<210> 237

<211> 3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 237

Asp	Val	Ser
1		

35

<210> 238

<211> 36

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 238

40

Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly
1				5					10					15	
Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala
			20					25					30		
Asp	Tyr	Tyr	Cys												
			35												

45

<210> 239

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 239

ES 2 546 543 T3

Ser Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Val Val
1 5

<210> 240
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 241
<211> 116
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 241

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

<210> 242
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 242

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 243
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 243

Gly Gly Ala Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 244
<211> 18
<212> PRT

ES 2 546 543 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 244

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10 15
Gly Ile

<210> 245

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 245

Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
1 5

<210> 246

<211> 38

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 246

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

<210> 247

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 247

Ala Arg Asp Ser Ala Gly Leu Gly Ala
1 5

<210> 248

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 248

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ala Val Ser Ser
1 5 10

<210> 249

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 249

```

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

```

<210> 250
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 250

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
          20           25

```

<210> 251
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 251

```

Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 1           5

```

<210> 252
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 252

```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 1           5           10           15
Tyr

```

<210> 253
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 253

```

Asp Ala Ser
 1

```

<210> 254
 <211> 36
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 254

```

Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 1      5      10      15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 20      25      30
Thr Tyr Tyr Cys
 35

```

5

<210> 255

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 255

```

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1      5

```

15

<210> 256

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 256

```

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 1      5      10

```

25

<210> 257

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 257

```

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

```

35

<210> 258

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 258

40

ES 2 546 543 T3

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
 20 25

<210> 259
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 259

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly
 1 5 10

<210> 260
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 260

Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10 15
 Leu

<210> 261
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 261

Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg
 1 5

<210> 262
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 262

Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser
 1 5 10 15
 Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr
 20 25 30
 Ala Thr Tyr Tyr Cys
 35

<210> 263
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 263

Ala His Arg Glu Ser Gly Pro Glu Phe Phe Gln His
 1 5 10

<210> 264

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

5 <400> 264

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

10 <210> 265
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 265

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

65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

20 <210> 266
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 266

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Asn Ser Ser
 20 25

25

30 <210> 267
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 267

Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Ile Thr Tyr
 1 5 10

35

<210> 268
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 268

ES 2 546 543 T3

Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 269
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 269

Gln Val Ser
 1

<210> 270
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 270

Asn Trp Asp Ser Glu Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly
 20 25 30
 Ile Tyr Tyr Cys

<210> 271
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 271

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr
 1 5

<210> 272
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 272

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 273
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 273

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

<210> 274
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 274

Glu Val Gln Val Ile Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser
 20 25

<210> 275
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 275

Gly Gly Thr Phe Ser Lys Tyr Ala
 1 5

<210> 276
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 276

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile

<210> 277
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 277

Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
1 5

<210> 278
<211> 38
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 278

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

<210> 279
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 279

Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
1 5 10 15
Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20 25

<210> 280
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 280

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 281
<211> 110
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 281

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

ES 2 546 543 T3

<210> 282
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 282

 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 20 25

 10
 <210> 283
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15
 <400> 283

 Gln Ser Val Ala Ser Arg Tyr
 1 5

 20
 <210> 284
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 25
 <400> 284

 Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Leu Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr

 30
 <210> 285
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 285

 35
 Gly Ala Ser
 1

 40
 <210> 286
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 286

 Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 45

 <210> 287
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50

<400> 287

Gln Gln Tyr Gly Arg Thr Pro Ser Val Thr
 1 5 10

5 <210> 288
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 288

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

15 <210> 289
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 289

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

25 <210> 290
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 290

Glu Val Gln Val Ile Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser
 20 25

30

<210> 291
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

<400> 291

Gly Gly Thr Phe Ser Lys Tyr Ala
1 5

<210> 292
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 292

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10 15
Gly Ile

<210> 293
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 293

Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
1 5

<210> 294
<211> 38
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 294

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

<210> 295
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 295

Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr

1 5 10 15
Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20 25

<210> 296
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 296

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 297
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 297

```

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

```

10

<210> 298
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 298

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Pro Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
          20           25

```

20

<210> 299
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 299

```

Gln Ser Ile Arg Ser Thr Tyr
 1           5

```

30

<210> 300
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 300

```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 1           5           10           15
Tyr

```

35

<210> 301
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 301

Gly Ala Ser
1

<210> 302
<211> 36
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 302

Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30
Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 303
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 303

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Ser
1 5

<210> 304
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 304

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 305
<211> 132
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 305

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

ES 2 546 543 T3

50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
 100 105 110
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 306
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 306

Glu Val Gln Val Ile Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser
 20 25

<210> 307
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 307

Gly Gly Thr Phe Ser Lys Tyr Ala
 1 5

<210> 308
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 308

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile

<210> 309
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 309

Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
 1 5

<210> 310
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 310

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Glu

1 5 10 15
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 311

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 311

Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 20 25

<210> 312

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 312

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 313

<211> 110

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 313

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

<210> 314

<211> 26

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 314

ES 2 546 543 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Ala Ser
 20 25

<210> 315
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 315

Gln Ser Val Arg Asn Asn Tyr
 1 5

<210> 316
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 316

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 317
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 317

Asn Gly Ser
 1

<210> 318
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 318

Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Asp Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 319
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 319

Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Arg Arg Val Thr
 1 5 10

<210> 320

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

5 <400> 320

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

10 <210> 321
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 321

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

20 <210> 322
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 322

25 Glu Val Gln Val Ile Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser
 20 25

30 <210> 323
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 323

35 Gly Gly Thr Phe Ser Lys Tyr Ala
 1 5

<210> 324
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 324

ES 2 546 543 T3

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile

<210> 325
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 325

Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
 1 5

<210> 326
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 326

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

<210> 327
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 327

Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 20 25

<210> 328
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 328

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 329
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 329

ES 2 546 543 T3

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

<210> 330
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 330

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 20 25

<210> 331
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 331

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 332
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 332

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 333
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 333

Gly Thr Ser
 1

<210> 334
 <211> 36

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 334

5

```

Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1      5      10      15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20      25      30
Val Tyr Tyr Cys
      35

```

<210> 335
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 335

```

Gln Arg Tyr Gly Ser Ser Pro Ala
 1      5

```

15

<210> 336
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 336

```

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1      5      10

```

25

<210> 337
<211> 132
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 337

```

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

```

35

<210> 338
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 546 543 T3

<400> 338

Glu Val Gln Val Ile Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser
 20 25

5

<210> 339

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 339

Gly Gly Thr Phe Ser Lys Tyr Ala
 1 5

15

<210> 340

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 340

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile

25

<210> 341

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 341

Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
 1 5

35

<210> 342

<211> 38

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 342

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

40

<210> 343

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 343

Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 20 25

<210> 344
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 344

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 345
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 345

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly

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

<210> 346
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 346

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 20 25

<210> 347
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 347

Gln Ser Ile Ser Lys Trp
 1 5

<210> 348

<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 348

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15
Tyr

<210> 349
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 349

15

Lys Ala Ser
1

<210> 350
<211> 36
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 350

Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala
20 25 30
Thr Tyr Tyr Cys
35

25

<210> 351
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 351

Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Ala Thr
1 5

35

<210> 352
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 352

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

45

<210> 353
<211> 132
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50

<400> 353

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

<210> 354
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 354

Glu Val Gln Val Ile Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser

20 25

<210> 355
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 355

Gly Gly Thr Phe Ser Lys Tyr Ala
 1 5

<210> 356
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 356

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile

<210> 357
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 357

Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
1 5

<210> 358
<211> 38
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 358

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

<210> 359
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 359

Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
1 5 10 15
Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20 25

<210> 360
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 360

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 361
<211> 110
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 361

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

ES 2 546 543 T3

<210> 362
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 362

 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Ala Ser
 20 25

 10
 <210> 363
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 363

 Gln Ser Val Arg Asn Asn Tyr
 1 5

 20
 <210> 364
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 364

 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile
 1 5 10 15
 Tyr

 30
 <210> 365
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 365

 Asn Gly Ser
 1
 35

 <210> 366
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 366

 Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Asp Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 45
 <210> 367
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 367

Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Arg Arg Val Thr
1 5 10

<210> 368
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 368

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 369
<211> 132
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 369

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

115
Thr Val Ser Ser
130

120

125

<210> 370
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 370

Glu Val Gln Val Ile Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser
20 25

<210> 371
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 371

Gly Gly Thr Phe Ser Lys Tyr Ala
1 5

<210> 372
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 372

 Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile
 10
 <210> 373
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

 <400> 373

 Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
 1 5
 20
 <210> 374
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 374

 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Glu
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 30
 <210> 375
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 375
 35
 Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 20 25

 <210> 376
 <211> 11
 40 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 376

 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 45

 <210> 377
 <211> 107
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*

<400> 377

```

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

```

5 <210> 378
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 378

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
          20           25

```

15 <210> 379
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 379

```

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1           5

```

25 <210> 380
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 380

```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 1           5           10           15
Tyr

```

30 <210> 381
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 381

```

Asp Ala Ser
 1

```

40 <210> 382
 <211> 36

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 382

5

```

Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1           5           10           15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
      20           25           30
Val Tyr Tyr Cys
      35

```

<210> 383

<211> 8

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 383

15

```

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 1           5

```

<210> 384

<211> 11

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 384

```

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1           5           10

```

25

<210> 385

<211> 132

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 385

```

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

```

35

<210> 386

<211> 25

<212> PRT

ES 2 546 543 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 386

```

      Glu Val Gln Val Ile Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ser
      1      5      10      15
      Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser
      20      25

```

5

<210> 387

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 387

```

      Gly Gly Thr Phe Ser Lys Tyr Ala
      1      5

```

15

<210> 388

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 388

```

      Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
      1      5      10      15
      Gly Ile

```

25

<210> 389

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 389

```

      Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
      1      5

```

35

<210> 390

<211> 38

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 390

```

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

```

40

<210> 391

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 391

45

Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 20 25

<210> 392
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 392

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 393
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 393

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

<210> 394
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 394

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 20 25

<210> 395
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 395

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

ES 2 546 543 T3

<210> 396
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 396
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 <210> 397
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 397
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 398
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 398
 Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 399
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 399
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr Ile Thr
 1 5 10
 <210> 400
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 400
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10
 <210> 401
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 401

```

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

```

5 <210> 402
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 402

```

Glu Val Gln Val Ile Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser
          20           25

```

15 <210> 403
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 403

```

Gly Gly Thr Phe Ser Lys Tyr Ala
 1           5

```

25 <210> 404
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 404

```

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1           5           10           15
Gly Ile

```

30 <210> 405
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 405

Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
1 5

5 <210> 406
<211> 38
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 406

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

10

15 <210> 407
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 407

Ala Arg Gly Trp Gly Arg Glu Gln Leu Ala Pro His Pro Ser Gln Tyr
1 5 10 15
Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20 25

20

25 <210> 408
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 408

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30 <210> 409
<211> 108
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 409

ES 2 546 543 T3

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

<210> 410
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 410

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 20 25

<210> 411
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 411

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 412
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 412

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 413
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 413

Gly Ala Ser
 1

<210> 414
 <211> 36

ES 2 546 543 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 414

5

```

Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1      5      10      15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
      20      25      30
Val Tyr Tyr Cys
      35

```

<210> 415
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 415

```

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Val
 1      5

```

15

<210> 416
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 416

```

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1      5      10

```

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano que se une selectivamente al epítipo de la glucoproteína G de Hendra y Nipah, en el que dicho anticuerpo incluye una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, en el que la cadena ligera variable tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 313 y en el que el anticuerpo se puede obtener mediante maduración por afinidad con respecto a un anticuerpo m102 que comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 17 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 25.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende un fragmento Fd.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende un fragmento Fab.
4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cadena variable comprende una región CD3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 311.
5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cadena variable comprende una región CD2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 309.
6. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 6, en el que el ácido nucleico comprende un vector que incluye una secuencia reguladora unida operablemente a dicho ácido nucleico.
8. Una célula huésped aislada que produce el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. Una preparación farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
10. Una preparación diagnóstica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
11. Una preparación farmacéutica de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de la enfermedad por el virus Hendra o la enfermedad por el virus Nipah.
12. Una preparación farmacéutica de la reivindicación 9 para su uso en la profilaxis de la enfermedad por el virus Hendra o la enfermedad por el virus Nipah.
13. Una preparación diagnóstica de la reivindicación 10 para su uso en el diagnóstico de la enfermedad por el virus Hendra o la enfermedad por el virus Nipah mediante la detección de la unión del anticuerpo como una determinación de la presencia de enfermedad por el virus Hendra o la enfermedad por el virus Nipah.
14. Un método de detección de la presencia de virus Hendra o Nipah en una muestra biológica, que comprende poner en contacto dicha muestra con la preparación diagnóstica de acuerdo con la reivindicación 10 y analizar la unión del anticuerpo como una determinación de la presencia de dicho virus Hendra o Nipah.

Fig. 1A

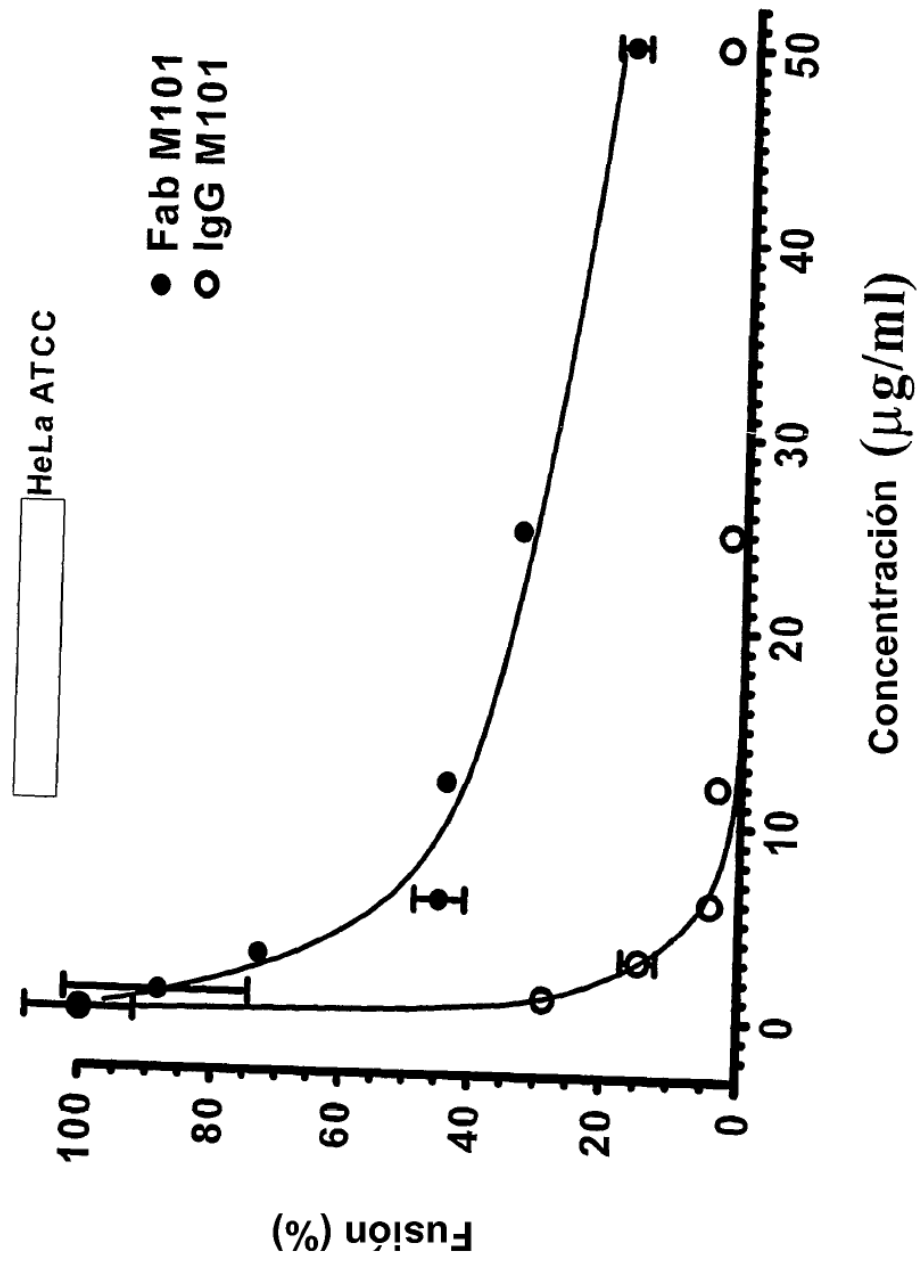


Fig. 1B

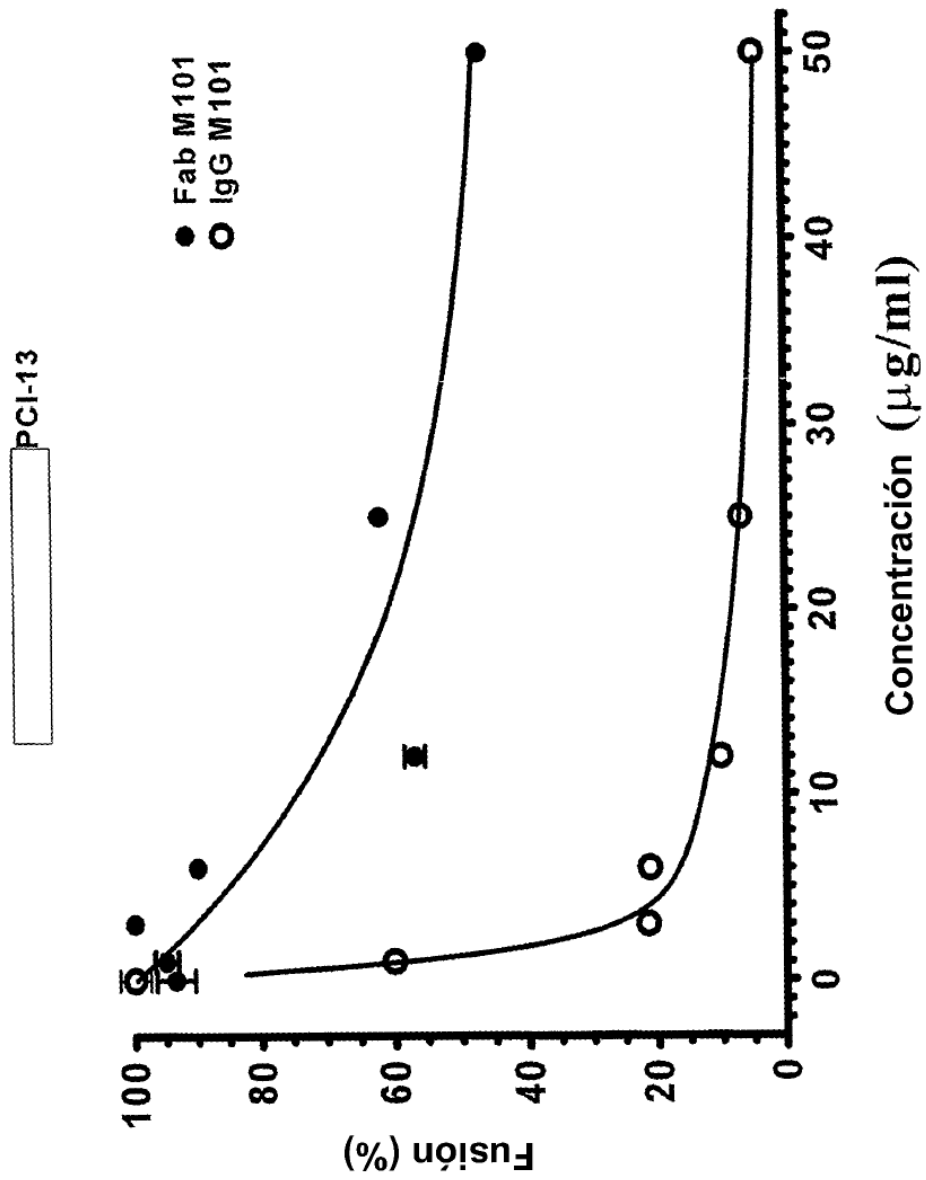
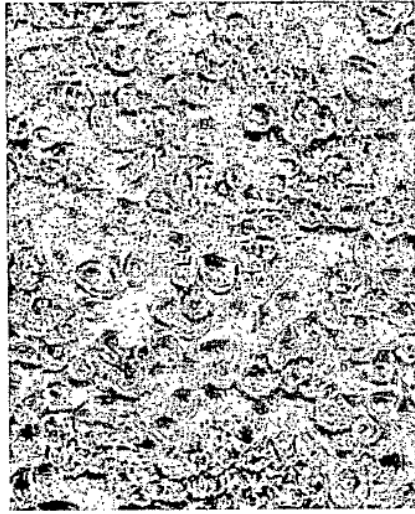


Fig. 2

Sin anticuerpo



IgG1 m101 (10 µg/ml)



Anticuerpo de control



Fab m101 (10 µg/ml)

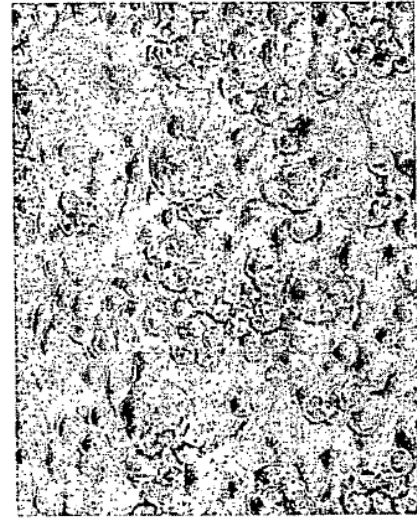


Fig. 3

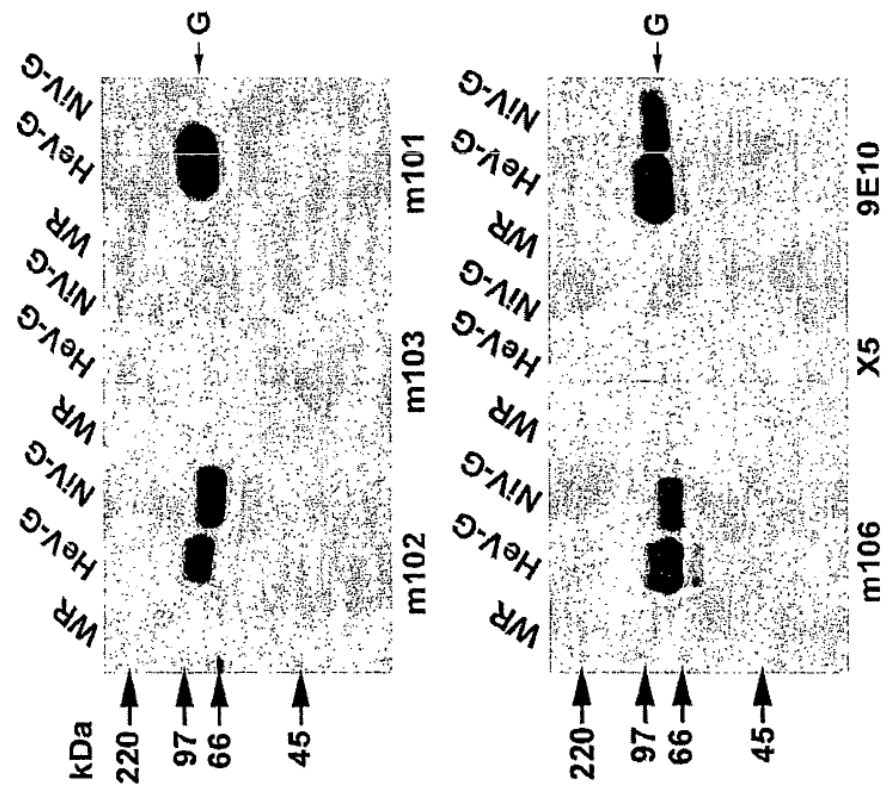


Fig. 4

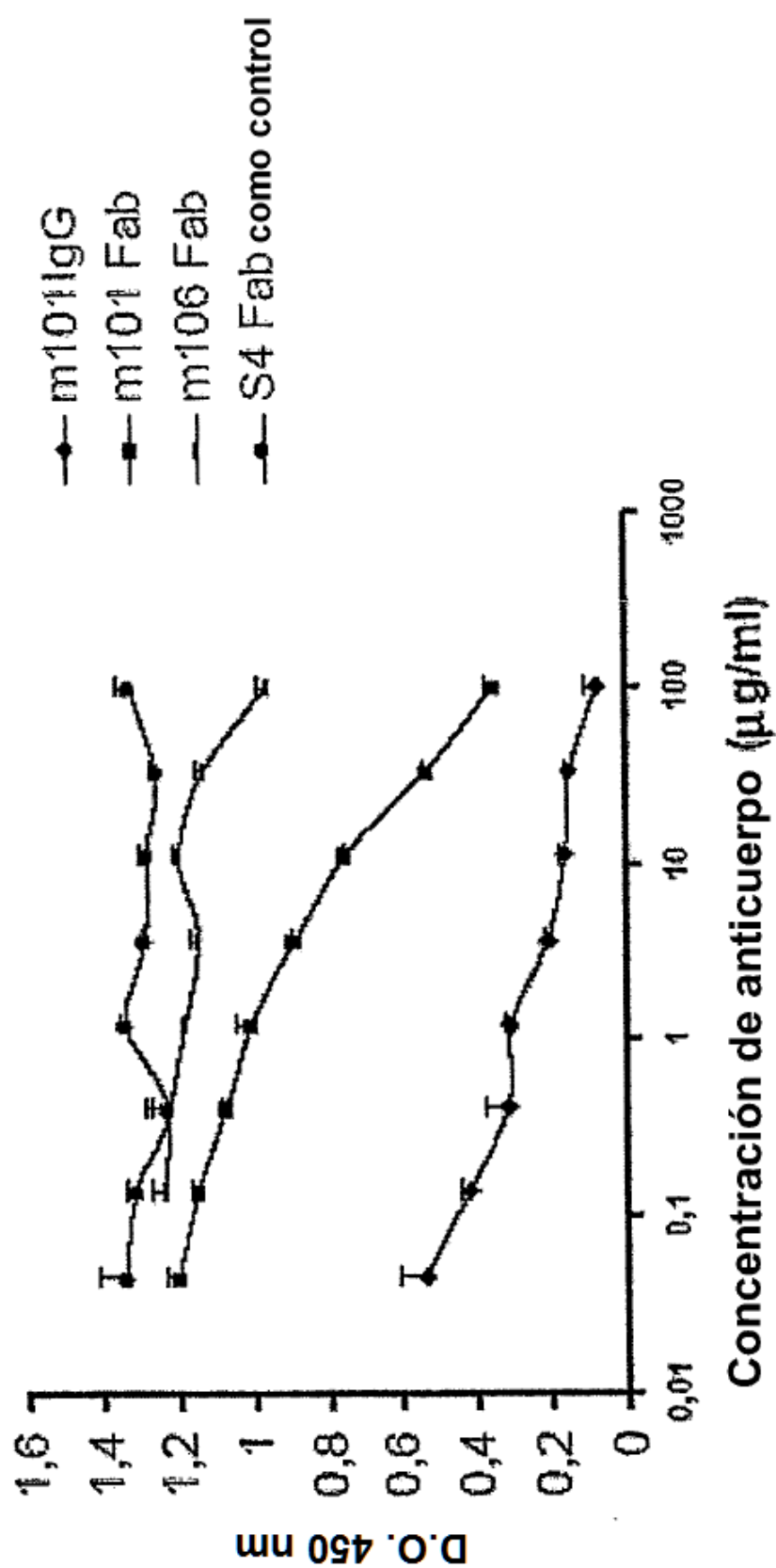
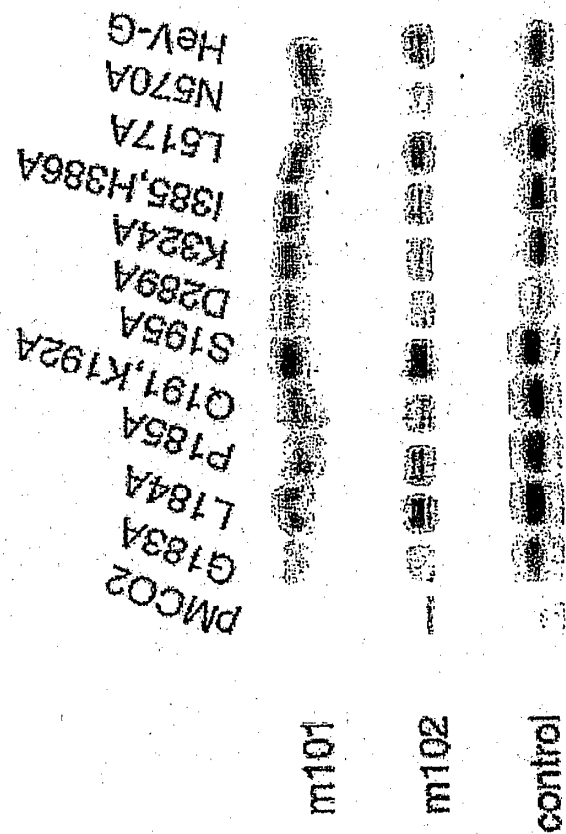
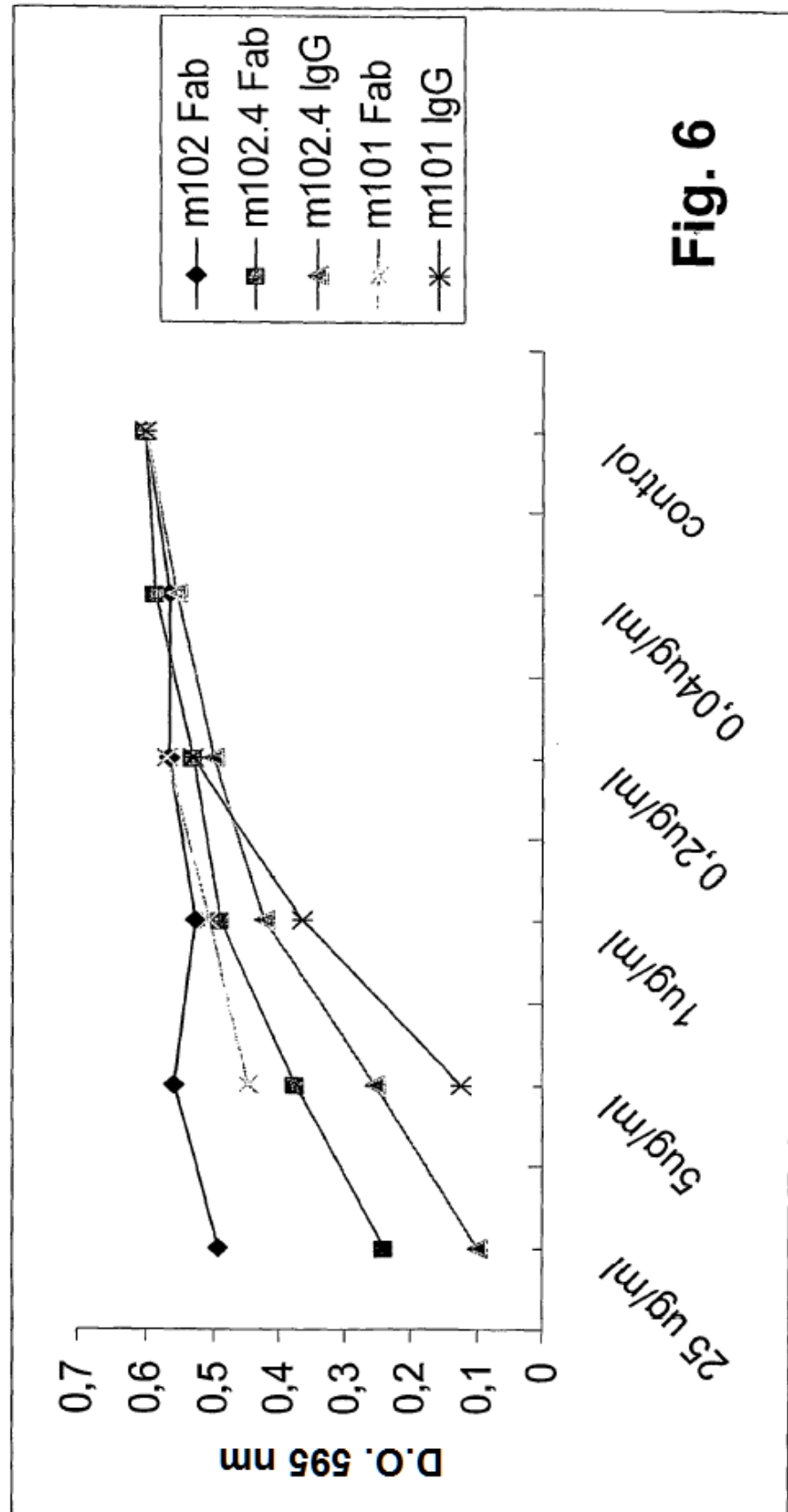


Fig. 5



Inhibición de la fusión mediada por Env de HEV mediante IgG m102.4 madurado por afinidad: Actividad más débil que IgG m101



*Inhibición de la fusión mediada por Env de NiV mediante IgG m102.4 madurado
por afinidad: Potencia excepcional*

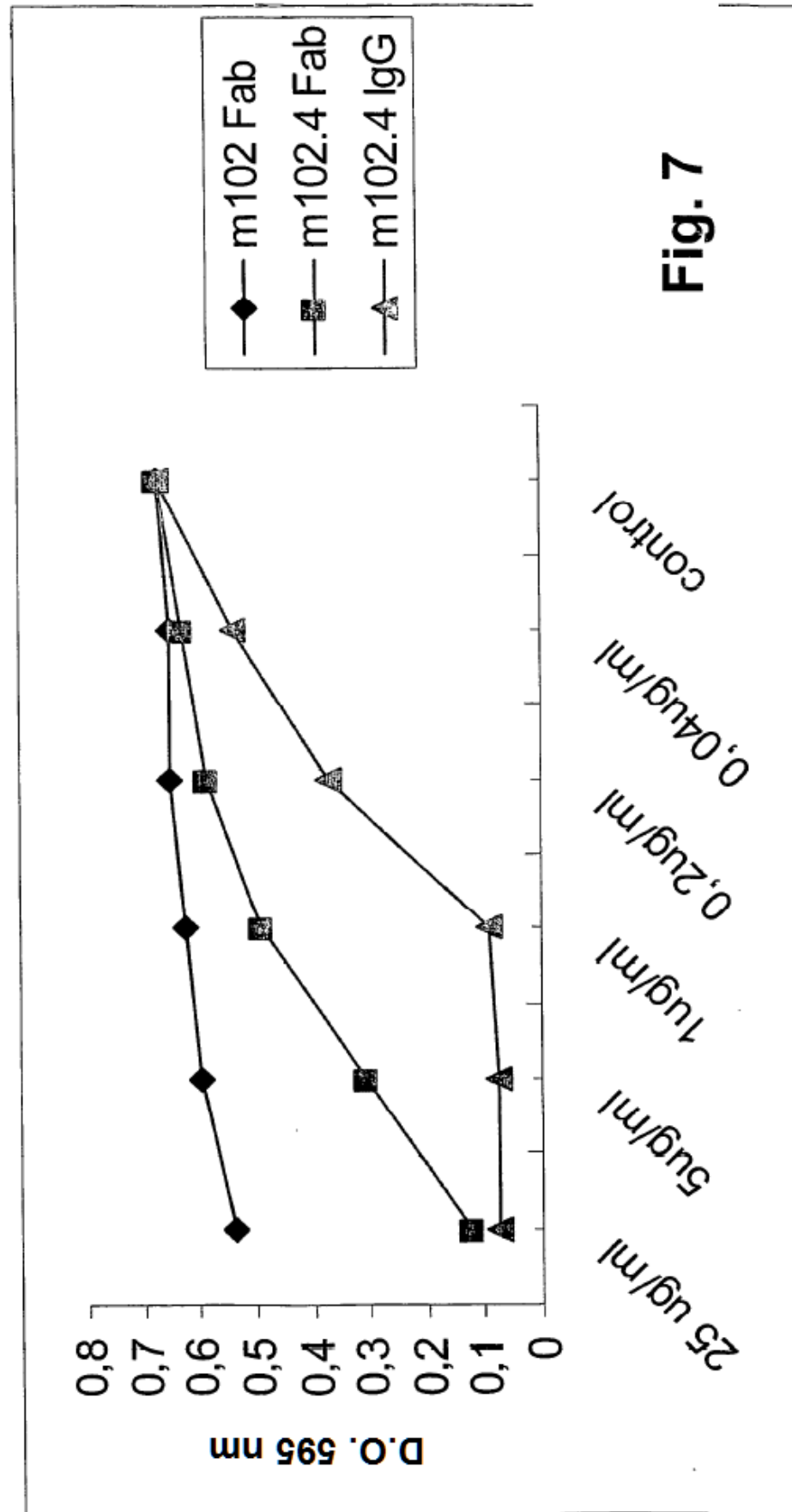
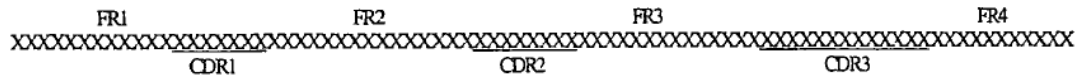


Fig. 7

Para todas las secuencias de VH y VL, se subrayaron las CDR1-3, y las FR1-4 fueron los fragmentos divididos por las tres CDR.

El siguiente ejemplo se puede aplicar a todas las secuencias.

Ejemplo:



Secuencias de m101-m107:

m101 VH3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ
GLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYME
LSSLRSGDTAVYYCARDPPGGYSYGPYYYYYGMDVWGQ
GTTVTVSS

m101 Vk1

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIGPWLAWYQQKPGKAP
KFLIYRASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT
YYCQQAHSFPFTFGPGTKVDIKRTVA

m102 VH1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKSSGGTFSSNYAINW
VRQAPGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGR
VTITDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARG
WGREQ LAPHPSQYYYYYYGMDVWGQGT T V T
VSS

m102 Vk3

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSITNGRLAWY
QQKPGQAPRLLIYGVSSRASGIPERFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSVLFPGPT
KVDIKRTVA

m103 VH3

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSW
VRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD
SRYHDAFDI W G Q G T M V T V S S

Fig. 8

m103 V_k2

D V V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y
L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A S G V P D R F S G
S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T L
Y T F G Q G T K L E I K R T V A

m104 V_H1

Q V Q L Q Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W
V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R
V T I T A D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R E
S S W L D A F D I W G Q G T M V T V S S

m104 V_k2

D V V M T Q S P L S L S V T A G E P A S I S C R S S Q S L L H S N G H I Y
L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y M A S N R A S G V P D R F S
G S G S G T D F T L R I N R V E T E D V G I Y Y C M Q S L H T T
R T F G Q G T K V E I K R T V A

m105 V_H3

Q V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H
W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K
G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
A R V G G I T G T A D A F D I W G Q G T M V T V S S

m105 V_k1

D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V Y S D G N T
Y L N W F Q Q R P G Q S P R R L I Y K V S N R D S G V P D R F S
G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C M Q G T H W
P F T F G P G T K V D I K R T V A

m106 V_H1

Q V Q L Q Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W
V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R
V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D
Q L A G Y Y Y D S S G Y H Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V
S S

m106 V_k1

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q
Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T
D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P I T F G Q G T
R L E I K R T V A

Fig. 8 (continuación ¹)

m107 VH1

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASSGYTFTGYYMH
WVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQG
RVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCAR
DHVGPDAFDIWGQGTMTVTVSS

m107 VL1

SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWY
QQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLHVVF
GGGTKLTVLGQPKA

Secuencias de las proteínas de VH+VL de los mab m108-117:

M108

VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD
YYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSGSTIYYADS
VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY
YCARVGGAFDIWGQGTMTVTVSS

VL

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYRQS
PGSAPTTVIYEGYQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGL
ETEDEADYYCQSYDATNHQVVFGGGTKLTVL

M109

VH

QMQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSG
YYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
CARGWFRDWYFDLWGRGTLVTVSS

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDLGWYQQRPG
KAPKLLIYAAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
SATYFCLDYQYPWTFGQGTKVEIKR

Fig. 8 (continuación ²)

M110

VH

E V Q L V Q S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D
Y A M H W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A
D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A
V Y Y C A S E G L P E T D D A F D I W G Q G T M V T V S S

VL

D V V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L Y S D G Y N Y L D W
Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S R R A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
N T V E A E D V G V Y Y C M Q G V E I P F T F G P G T K V E I K R

M111

VH

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S G Y T F T D
Y Y M H W V Q Q A P G K G L E W M G L V D P E D G E T I Y A
E K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y M E L S S L R S E D T A V
Y Y C A T E G A D Y W G Q G T L V T V S S

VL

D V V M T Q S P L S L P V A L G Q P A S I S C R S S Q S L V H S D G N T Y L N
W F Q Q R P G Q S P R R L L Y K V S N R E S G V P D R F S G S G S G S D F T L K
I S R V E A E D V G I Y Y C M Q G T H W P P I T F G Q G T R L E I K R

M112

VH

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S G Y T F T D
Y Y M H W V Q Q A P G K G L E W M G L V D P E D G E T I Y A
Q K F Q G R V T I T A D T S T N T A Y M E L S S L R S E D T A V
Y Y C A T D G A D Y W D Q G T L G T V S T

VL

Q S V L T Q P P S V S G A P G Q T V T I S C T G S S S N I G G D S D V H W Y Q Q
L P G S A P K L L I Y G N R N R P S G V P D R F S G S R S G T S A S L A V I G V
Q A D D E A D Y Y C Q C Y D S S L N G Y V F G P G T K V I V L

M113

VH

Q V Q L Q Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S
Y A I S W V R Q A P G Q G L E W M G W T N P N S G G T N Y A
Q K L Q G R V T M T T D T S T S T A Y M E L R S L R S D D T A
V Y Y C A N Y K L Q S D A F D I W G Q G T M V T V S S

Fig. 8 (continuación ³)

VL

DIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNFLVWFQQKP
GKAPKSLIYAASRLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQHYKSYPLTFGGGKVEIKR

M114

VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS
Y A I SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVY
YCARAGPVGATTGTFDYWGQGTLVTVSS

VL

DIVMTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCQQYGSSFTFGPGTKVDIKR

M115

VH

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFRS
Y A I SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVY
YCARGSQSYDHYYYYGM DVWGQGTTVTVSS

VL

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSSDVGGYNYVSWYQQ
HPGKAPKLMIFDVSNRPSGVSNRLSGSKSGNTASLTISGL
QAEDEADYYCSSYTSNTVVFGGGKLTVL

M116

VH

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGAFSS
Y A I SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVY
YCARDSAGLGAWGQGTLLVAVSS

VL

DIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKP
GKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQFNSYPLTFGQGTRLEIKR

Fig. 8 (continuación ⁴)

M117

VH

QITLKESGPTLVKPTQTLLTLCTFSGFSLSTS SG
VGVGWIRQPPGKALEWLALIYWDDDKRYSPS
LKSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDATY
YCAHRESGPEFFQHWGQGTLVTVSS

VL

DVVM TQSPLSLPVTLGQPASISCNSSQSLVYSNGITYLNW
FHQRPGQSPRRLIYQVSNWDSEVPDRFSGSGSATDFTLKI
SRVEADDVGIYYCMQGTHWPPTFGQGTRLEIKR

Secuencias de 9 mutantes de m102:

M102.2

VH

EVQVIQSGADVKKPGSSVKVSCKSSGGTFSKYAINWVRQ
APGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITTDESTSTA
YMELSSLRSED TAVYYCARGWGREQ LAPHPSQYYYYYY
GMDVWGGQGTTVTVSS

VL

EIVM TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASRYLAWYQH
KPGLAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCQQYGRTPSVTFGGGKVEIKR

M102.3

VH

EVQVIQSGADVKKPGSSVKVSCKSSGGTFSKYAINWVRQ
APGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITTDESTSTA
YMELSSLRSED TAVYYCARGWGREQ LAPHPSQYYYYYY
GMDVWGGQGTTVTVSS

VL

EIVMTQSPGTPSLSPGERATLSCRASQSIRSTYLAWYQQK
PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQYGRSPSFSGGKVEIKR

Fig. 8 (continuación ⁵)

M102. 4

VH

EVQVIQSGADVKKPGSSVKVSCCKSSGGTFSKYAINWVRQ
APGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITTDESTSTA
YMESSLRSEDTAVYYCARGWGREGQLAPHPSQYYYYYY
GMDVWGQGTTVTVSS

VL

EIVMTQSPGTLAPGERATLSCWASQSVRNNYLAWYQQ
KPGQAPRLVIYNGSTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLD
PEDFAVYYCQQYGNSRRVTFGGGGTKVEIKR

M102. 5

VH

EVQVIQSGADVKKPGSSVKVSCCKSSGGTFSKYAINWVRQ
APGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITTDESTSTA
YMESSLRSEDTAVYYCARGWGREGQLAPHPSQYYYYYY
GMDVWGQGTTVTVSS

VL

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIYGTSTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQRYGSSPAFGQGGTKVEIKR

M102.11

VH

EVQVIQSGADVKKPGSSVKVSCCKSSGGTFSKYAINWVRQ
APGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITTDESTSTA
YMESSLRSEDTAVYYCARGWGREGQLAPHPSQYYYYYY
GMDVWGQGTTVTVSS

VL

DIQMTQSPATLSASIGDRVTITCRASQSISKWLAWYQQKP
GKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPD
DFATYYCQQYINYATFGQGGTKVEIKR

M102.12

VH

EVQVIQSGADVKKPGSSVKVSCCKSSGGTFSKYAINWVRQ
APGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITTDESTSTA
YMESSLRSEDTAVYYCARGWGREGQLAPHPSQYYYYYY
GMDVWGQGTTVTVSS

Fig. 8 (continuación ⁶⁾)

VL

EIVM TQSPGTL~~SL~~APGERATLSCWASQSVRNNYLAWYQQ
KPGQAPRLVIYNGSTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLD
PEDFAVYYCQQYGNSRRVTFGGG~~TK~~VEIKR

M102.13

VH

EVQVIQSGADVKKPGSSVKVSCKSSGGTFSKYAINWVRQ
APGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITTTDESTSTA
YME~~LSS~~LRSEDTAVYYCARGWGREQ~~LAPH~~PSQYYYYYYY
GMDVWGQGTTTVTVSS

VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ
APRLLIYDASN~~RAT~~GIPARFSGSGSGTDFTLTIS~~SLE~~PE~~DF~~AV
YYCQQR~~SNWPT~~FGQGTKVEIKR

M102.15

VH

EVQVIQSGADVKKPGSSVKVSCKSSGGTFSKYAINWVRQ
APGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITTTDESTSTA
YME~~LSS~~LRSEDTAVYYCARGWGREQ~~LAPH~~PSQYYYYYYY
GMDVWGQGTTTVTVSS

VL

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP
GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF
AVYYCQQYGSSPTITFGQGTRLEIKR

M102.16

VH

EVQVIQSGADVKKPGSSVKVSCKSSGGTFSKYAINWVRQ
APGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITTTDESTSTA
YME~~LSS~~LRSEDTAVYYCARGWGREQ~~LAPH~~PSQYYYYYYY
GMDVWGQGTTTVTVSS

VL

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP
GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF
AVYYCQQYGSSPVFGQGTKLEIKR

Fig. 8 (continuación ⁷)